

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO BIOMÉDICO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS

Lídia Maria Rosa da Silva

**EVOLUÇÃO DA PERIODONTITE EXPERIMENTAL EM RATOS NA
AUSÊNCIA E PRESENÇA DE HIPERTENSÃO ARTERIAL
RENOVASCULAR**

VITÓRIA
2007

LÍDIA MARIA ROSA DA SILVA

**EVOLUÇÃO DA PERIODONTITE EXPERIMENTAL EM RATOS NA
AUSÊNCIA E PRESENÇA DE HIPERTENSÃO ARTERIAL
RENOVASCULAR**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciências Fisiológicas.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Silvana dos Santos Meyrelles

VITÓRIA
2007

LÍDIA MARIA ROSA DA SILVA

**EVOLUÇÃO DA PERIODONTITE EXPERIMENTAL EM RATOS NA
AUSÊNCIA E PRESENÇA DE HIPERTENSÃO ARTERIAL
RENOVASCULAR**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da
Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do
grau de Mestre em Ciências Fisiológicas

Aprovada em 1 de novembro de 2007

Prof^a. Dr^a. Tânia Regina Grão Velloso – Co-orientadora - UNIFAL

Prof. Dr. Antônio de Melo Cabral – Examinador, PPGCF - UFES

Prof^a. Dr^a. Silvana dos Santos Meyrelles – Orientadora, PPGCF - UFES

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO

Vitória, novembro de 2007

Dados Internacionais de Catalogação-na-publicação (CIP)
(Biblioteca Setorial de Ciências da Saúde,
Universidade Federal do Espírito Santo, ES, Brasil)

S586e Silva, Lídia Maria Rosa da, 1969-
Evolução da periodontite experimental em ratos na ausência e
presença de hipertensão arterial renovascular / Lídia Maria Rosa
da Silva. – 2007.
69 f. : ilustr.

Orientador: Silvana dos Santos Meyrelles.
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Espírito
Santo, Centro de Ciências da Saúde.

1. Periodontite. 2. Hipertensão renovascular. I. Meyrelles, Silva
dos Santos. II. Universidade Federal do Espírito Santo. Centro de
Ciências da Saúde. III. Título.

CDU:612

À Deus
Que em sua infinita bondade
Concede-me a vida,
Guia meus passos
Ilumina meus caminhos.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Aos meus pais Ilso e Alice e as minhas irmãs Conceição e Isabel, partes da minha vida e de quem tenho muito orgulho.

Ao meu noivo Fernando, por seu amor, paciência, companheirismo, dedicação e pelo auxílio nas fotografias.

Aos meus sobrinhos Gabriel, Benjamin, Fernanda e Beatriz, simplesmente por existirem e me encherem de alegria.

Aos meus cunhados Eugênio e Vladimir, pelo apoio constante.

Às amigas Maria Okada, Ana Paula e Camille, pelo carinho e ajuda muito mais do que bem vinda.

Muito obrigada!

AGRADECIMENTOS

A minha orientadora Prof^a. Dr^a. Silvana dos Santos Meyrelles e seu esposo, o Prof. Dr. Elisardo Corral Vasquez, que me acolheram em seu laboratório, pela oportunidade e confiança dispensada, pelo exemplo de dedicação, organização e disciplina demonstrados tanto no laboratório quanto nas aulas teóricas, e sobretudo pela ampla visão científica, encarando os desafios como oportunidades e não como dificuldades.

A Prof^a. Dr^a. Tânia Regina Grão Velloso, minha co-orientadora, pela dedicação à pesquisa, exemplo de profissionalismo e amizade, cujo apoio foi fundamental na execução desse trabalho.

Ao Prof. Dr. Nyan Florêncio da Silva, que me acolheu como agregada em seu laboratório, por seu desprendimento, confiança e exemplo.

A Lucienne Bessoni Oliveira, pela dedicação e competência na confecção das lâminas.

A Prof^a. Dr^a. Denise Tostes Oliveira, da Faculdade de Odontologia de Bauru-Universidade de São Paulo (FOB-USP), pela atenção dispensada e por permitir o uso dos equipamentos em seu departamento.

Aos professores da Faculdade de Odontologia de Piracicaba - Universidade Estadual de Campinas (FOP-UNICAMP), Dr. Antônio Wilson Sallum e Dr. Francisco Humberto Nociti Jr., pelas valiosas informações.

A todos os amigos do Laboratório de Transgenes e Controle Cardiovascular: Robéria, Verônica, Ágata, Thiago, Breno, Isabelle, Raquel, Clarissa, Bianca, Camile, Máine, João Paulo, Flávia, Fernanda, Bernadete, Geovana, Liz e Adriana, pelas experiências compartilhadas e pelos momentos de agradável convívio.

Aos servidores do Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas – Universidade Federal do Espírito Santo (PPGCF-UFES), Fonseca e Cláudia da secretaria, e Amarildo e Erli do biotério, pelo trabalho dedicado.

Enfim, a todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho, meus sinceros agradecimentos.

Aos animais utilizados meu profundo respeito.

*“Só sabemos com exatidão quando sabemos pouco,
à medida que vamos adquirindo conhecimentos,
instala-se a dúvida”.
(Goeth, J.)*

RESUMO

Doença periodontal é uma doença inflamatória crônica, multifatorial, resultado do desequilíbrio entre hospedeiro e microorganismos presentes no biofilme dental que pode levar à perda do dente. Embora existam evidências de que a doença periodontal possa influenciar a saúde geral e a susceptibilidade para determinadas doenças sistêmicas, a literatura é escassa no que diz respeito à relação entre periodontite e hipertensão arterial. Assim sendo, o objetivo deste estudo foi avaliar microscopicamente o efeito da hipertensão renovascular na gravidade da doença periodontal induzida em ratos. Foram utilizados 11 ratos Wistar, com aproximadamente 5 semanas e pesando entre 150-170 g, divididos randomicamente em 2 grupos: Hipertensos (n=6) e SHAM (n=5). Os animais foram anestesiados, submetidos à laparotomia e afastamento das alças intestinais, e apenas no grupo hipertenso foi realizada a clipagem da artéria renal esquerda (2R1C). No décimo quarto dia os animais foram submetidos à indução da periodontite experimental por ligadura subgingival no primeiro molar inferior esquerdo. O molar contralateral não foi ligado, servindo como controle. Após 14 dias da colocação da ligadura, com o animal acordado foram obtidos os registros hemodinâmicos de PAM ($109 \pm 1,4$ mmHg SHAM vs. 178 ± 5 mmHg hipertensos) e FC (351 ± 4 bpm SHAM vs. 370 ± 12 bpm hipertensos). Em seguida os animais foram sacrificados e a mandíbula removida para processamento histológico. Os parâmetros empregados na avaliação da periodontite foram: contagem de neutrófilos, número de vasos sangüíneos e perda óssea alveolar na região interproximal distal ao molar ligado e ao dente controle. Na análise intra-grupos verificamos aumento significativo nos números de neutrófilos e de vasos nos lados com periodontite quando comparados ao lado sem periodontite nos animais SHAM ($2,2 \pm 0,3$ vs. $14,6 \pm 2,2$ e $4,6 \pm 0,8$ vs. $13,1 \pm 1,7$ respectivamente) e hipertensos ($2,3 \pm 0,3$ vs. $15 \pm 0,9$ e $4,5 \pm 0,84$ vs. $13,1 \pm 1,8$ respectivamente). Embora haja diferenças significantes ($p < 0,05$) para os parâmetros avaliados em relação à periodontite na análise intra-grupos, não houve diferença ($p > 0,05$) entre os grupos, com uma perda óssea similar observada nos animais SHAM com periodontite ($0,74 \pm 0,07$ mm) e hipertensos com periodontite ($0,87 \pm 0,10$ mm). Estes dados nos permitem concluir que em ratos, a hipertensão renovascular não foi capaz de influenciar a gravidade da doença periodontal induzida no período estudado.

Palavras chave: hipertensão renovascular; periodontite experimental.

ABSTRACT

Periodontal disease is a chronic and multifactorial inflammatory disease, that results from a unbalance between the host and the microorganisms of dental biofilm and can lead to tooth loss. Although there are evidences that periodontal disease may influence the general health and the susceptibility to determined systemic diseases, there are few investigations regarding the relationships between periodontitis and arterial hypertension. Therefore, the goal of this study was to evaluate histological changes induced by renovascular hypertension in rats with periodontal disease. Male Wistar rats (5 week-old, 150-170 g) were separated in two groups: Hypertensive (n=6) and SHAM (n=5). The animals were anesthetized, submitted to laparotomy and only the hypertensive group received a silver clip in the left renal artery (2K1C). Fourteen days after this procedure, the animals were submitted to experimental periodontitis induction through the subgingival ligature at first left inferior molar. The non-ligated contralateral molar was considered as control situation. Once again, fourteen days after the periodontitis induction, the MAP ($109 \pm 1,4$ mmHg SHAM vs 178 ± 5 mmHg hypertensive) and HR (351 ± 4 bpm SHAM vs 370 ± 12 bpm hypertensive) hemodynamic measurements were performed in the conscious animals. The animals were sacrificed and the jaw was removed to histological processing. The parameters used to evaluate the periodontitis were: PMNs, the number of blood vessels and alveolar bone loss in the ligated and control molar at distal interproximal region. The results showed that there were a significant raise in PMNs and number of blood vessels at the periodontitis side when compared to control side in SHAM animals ($2,2 \pm 0,3$ vs. $14,6 \pm 2,2$ and $4,6 \pm 0,8$ vs. $13,1 \pm 1,7$ respectively) and hypertensive animals ($2,3 \pm 0,3$ vs. $15 \pm 0,9$ and $4,5 \pm 0,84$ vs. $13,1 \pm 1,8$ respectively). Although there are significant changes between the ligated and non ligated molar in each group, there were no differences in bone loss between the ligated molar of SHAM ($0,74 \pm 0,07$ mm) and hypertensive ($0,87 \pm 0,10$ mm) animals. Based on these data, we can conclude that in rats, the renovascular hypertension did not aggravated the periodontal disease.

Key words: Renovascular hypertension, Experimental periodontitis.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Propriedades pró-inflamatórias da Ang II e de modulação da resposta imunológica na injúria vascular, envolvendo mecanismos de quimiotaxia e proliferação celular e reações de oxidoredução	20
Figura 2.	Artéria renal esquerda isolada e em seguida clipada para indução de hipertensão renovascular (2R1C).....	34
Figura 3.	Animal anestesiado e posicionado em mesa operatória, facilitando o acesso à região de molares.....	35
Figura 4.	Ligadura instalada (A) e delicadamente inserida subgengivalmente para indução da doença periodontal inflamatória (B)	35
Figura 5.	Avaliação histométrica da perda óssea alveolar na região interproximal distal ao primeiro molar inferior, medida linearmente da junção cimento-esmalte (JCE) à crista óssea alveolar (COA)	39
Figura 6.	Aspecto macroscópico do rim clipado (à direita) e não clipado (à esquerda) pertencentes a um mesmo animal do grupo Hipertenso	43
Figura 7.	Registros típicos dos valores de PAP (mmHg), PAM (mmHg) e FC (bpm) em animal do grupo SHAM e do grupo Hipertenso após 28 dias	44
Figura 8.	Aspecto macroscópico do molar que recebeu a ligadura (A) e seu homólogo contra-lateral sem ligadura (B), pertencente ao mesmo animal, após processo de descalcificação	45
Figura 9.	Região interproximal distal ao primeiro molar.....	46

LISTA DE ABREVIATURAS E OU SIGLAS

1R1C	Um rim um clipe
2R1C	Dois rins um clipe
Ang I	Angiotensina I
Ang II	Angiotensina II
AT ₁	Receptor de angiotensina II
ANOVA	Análise de variância
bpm	Batimentos por minuto
CEUA	Comitê de Ética no Uso de Animais
COA	Crista óssea alveolar
COBEA	Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
DP	Doença Periodontal
d.p.	Desvio-padrão
ECA	Enzima Conversora de Angiotensina
EDTA	Ácido Etilenodiaminotetracético
EMESCAM	Escola Superior de Ciências da Saúde da Santa Casa de Misericórdia de Vitória
EPM	Erro Padrão da Média
FC	Frequência Cardíaca
g	Gramma
HE	Hematoxilina e Eosina
IL	Interleucina
i.p.	Intraperitonal
JCE	Junção cimento-esmalte
LPS	Lipopolissacarídeos

LTCC	Laboratório de Transgenes e Controle Cardiovascular
min	minuto(s)
ml	mililitro(s)
mmHg	milímetros de mercúrio
MMPs	Metaloproteinases
µm	micrômetro
NIH	National Institutes of Health
NO	Óxido nítrico
PAM	Pressão Arterial Média
PAP	Pressão Arterial Pulsátil
PgE ₂	Prostaglandina E ₂
PMNs	Polimorfonucleados
PPGCF	Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas
ROS	Espécies Reativas de Oxigênio
SRAA	Sistema renina-angiotensina-aldosterona
SHR	ratos espontaneamente hipertensos
TNF-α	<i>Tumor Necrosis Factor alpha</i> (Fator de Necrose Tumoral alfa)
UFES	Universidade Federal do Espírito Santo
UNIFAL	Universidade Federal de Alfenas

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
2 REVISÃO DA LITERATURA	16
2.1 HIPERTENSÃO RENOVASCULAR	16
2.1.1 Hipertensão renovascular experimental	20
2.2 ETIOPATOGENIA DA DOENÇA PERIODONTAL	22
2.2.1 Doença periodontal experimental	25
2.3 PERIODONTITE E SAÚDE SISTÊMICA	27
3 OBJETIVOS	30
3.1 OBJETIVO GERAL	30
3.2.1 Objetivos específicos	30
4 MATERIAIS E MÉTODOS	31
4.1 ANIMAIS	31
4.2 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	31
4.2.1 Anestesia	32
4.2.2 Indução da hipertensão renovascular	32
4.2.3 Indução da doença periodontal inflamatória	34
4.2.4 Cateterização da artéria femoral	36
4.2.5 Registros hemodinâmicos	37
4.3 PROCESSAMENTO DOS ESPÉCIMES	37
4.3.1 Análise microscópica	39
4.3.2 Análise histométrica	39
4.3.3 Análise histopatológica	40
4.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA	41

5 RESULTADOS	42
5.1 PESO CORPORAL	42
5.2 PRESSÃO ARTERIAL E FREQUÊNCIA CARDÍACA	42
5.3 PERDA ÓSSEA ALVEOLAR.....	45
5.3.1 Aspecto macroscópico	45
5.3.2 Avaliação microscópica	45
5.4 ATIVIDADE INFLAMATÓRIA	48
5.5 AVALIAÇÃO QUANTITATIVA DE VASOS.....	49
6 DISCUSSÃO	50
7 CONCLUSÃO	60
8 REFERÊNCIAS	61
ANEXOS	67

1 INTRODUÇÃO

Evidências científicas nos mostram que saúde bucal e saúde sistêmica podem estar fortemente correlacionadas, surgindo um novo paradigma representado pela Medicina Periodontal ou Periodontia Médica, que vem se destacando, sobretudo por buscar na área básica, mecanismos fisiopatológicos de ligação entre as doenças periodontais e alterações sistêmicas, numa relação bidirecional.

As doenças periodontais estão entre as doenças crônicas mais comuns em humanos, podendo levar à perda do dente pela destruição de seus elementos de sustentação. A periodontite apresenta etiologia multifatorial envolvendo fatores microbianos, imunológicos, genéticos e ambientais, portanto alterações no equilíbrio fisiológico do hospedeiro podem mudar a etiologia, extensão, curso e resposta ao tratamento das doenças periodontais. Alterações na resposta inflamatória do hospedeiro podem ser decorrentes de diversos fatores sistêmicos e a ativação do sistema renina-angiotensina, eleva os níveis de angiotensina II, que possui propriedades pró-inflamatórias podendo modular a resposta inflamatória local envolvendo mecanismos de quimiotaxia, proliferação celular e reações de óxido-redução. Níveis elevados de angiotensina II podem ser encontrados na hipertensão arterial renovascular e embora estudos apontem a participação da angiotensina II como modulador da resposta imunológica na injúria vascular, com aumento na produção de IL-1, IL-6, TNF- α , substâncias estas envolvidas na progressão da doença periodontal inflamatória, não existem dados na literatura sobre uma possível correlação entre hipertensão renovascular e periodontite.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 HIPERTENSÃO RENOVASCULAR

A Organização Mundial de Saúde define a hipertensão arterial como sendo a elevação da pressão arterial sistólica acima de 140mmHg e ou da pressão arterial diastólica acima de 90mmHg, e estima que atualmente cerca de 15 a 20% da população mundial seja hipertensa. Segundo dados da Sociedade Brasileira de Hipertensão (2006), estima-se que no Brasil cerca de 30% da população adulta e 60% dos idosos sejam hipertensos, sendo que esses valores podem ser ainda maiores, uma vez que a hipertensão é uma condição silenciosa e geralmente subnotificada.

A hipertensão arterial possui uma etiologia multifatorial (PAGE, 1967) e expõe o indivíduo a maiores riscos para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares e cerebrovasculares, podendo reduzir sua qualidade e expectativa de vida, representando um alto custo social.

A hipertensão renovascular é uma forma grave de hipertensão arterial podendo ser definida como “[...] a elevação da pressão arterial conseqüente à presença de estenose da artéria renal que pode ser curada ou amenizada pela revascularização renal” (TAYLOR; NALLY; AURELL, 1996), embora não haja um consenso sobre sua prevalência em virtude dessa apresentar uma diversidade em relação a faixa etária e perfil clínico dos pacientes estudados, estima-se que ela represente cerca de 1 a 4% do total de hipertensos, sendo o tipo mais freqüente de hipertensão secundária

potencialmente curável, além de ser a principal causa cirurgicamente reversível da insuficiência renal crônica (BERTOLOTTO et al., 2003).

Dentre os fatores etiológicos que desencadeiam a hipertensão renovascular podemos citar as lesões de natureza aterosclerótica como as mais freqüentes (65%), diferentes tipos de displasia fibromuscular (30%) (FILIPPO et al., 2000), além de outros fatores de menor ocorrência como a poliarterite nodosa, esclerose sistêmica progressiva e a neurofibromatose, dentre outros.

FISIOPATOLOGIA

A presença de estenose da artéria renal superior a 75% vai ocasionar diminuição do fluxo sangüíneo a este rim e redução da filtração glomerular, desencadeando uma resposta de hiperatividade do sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA), resultando na elevação da pressão arterial, como resposta para se manter a perfusão renal adequada (DUSTAN, 1997)

A homeostasia cardiovascular é mantida por meio da interação de diversos sistemas fisiológicos atuando simultaneamente e de maneira complexa, mantendo a pressão arterial dentro de uma faixa relativamente estreita de variação. O rim desempenha um papel importante nesse controle da pressão arterial, e o seu estudo alcançou relevância após os clássicos experimentos de Goldblatt (1934) quando destaca a participação do sistema renina-angiotensina na fisiopatologia da hipertensão arterial.

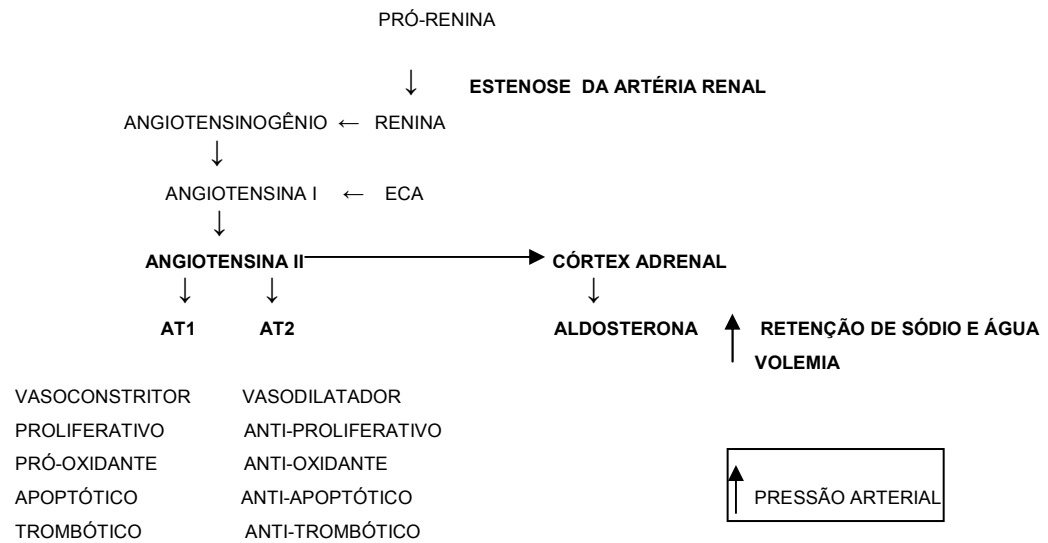
SISTEMA RENINA-ANGIOTENSINA-ALDOSTERONA

O sistema renina-angiotensina-aldosterona clássico atua na regulação fisiológica de volume, balanço eletrolítico e pressão arterial por meio de uma cascata de eventos que se inicia com a liberação de uma enzima proteolítica, a renina, que é principalmente produzida e armazenada nas células justaglomerulares dos rins sob forma inativa (pró-renina). Os mecanismos intra-renais primários que regulam a liberação de renina em condições fisiológicas normais são:

- a) diminuição da pressão de perfusão renal;
- b) baixa carga de cloreto de sódio na mácula densa;
- c) estimulação dos receptores β_1 adrenérgicos renais.

Desta forma, estenose significativa na artéria renal vai promover diminuição do fluxo sangüíneo ao rim, ocasionado aumento na produção e liberação de renina, que vai agir sobre o angiotensinogênio, produzindo Angiotensina I no fígado. A Angiotensina I, por sua vez sofre a ação da Enzima Conversora de Angiotensina (ECA) em nível pulmonar, dando origem a Angiotensina II, que por meio de seu receptor AT_1 exerce ação vasoconstritora, proliferativa, pró-oxidante e trombótica, dentre outras. A Angiotensina II também atua estimulando a supra-renal a produzir aldosterona, que por sua vez atua promovendo retenção de sódio e água, aumentando o volume extracelular e o conteúdo de sódio plasmático, contribuindo para o aumento da pressão arterial.

SISTEMA RENINA-ANGIOTENSINA



Fluxograma 1. Modelo parcial do Sistema Renina-Angiotensina (SRA)

Cascata de eventos resultando em hipertensão renovascular em decorrência de ativação do sistema renina-angiotensina. Enzima Conversora de Angiotensina (**ECA**) **AT₁** e **AT₂** – Receptores da Angiotensina II.

Além do SRA clássico descrito acima, existem sistemas renina-angiotensina teciduais distribuídos em diferentes órgãos (coração, rins, vasos sangüíneos, pâncreas, glândula adrenal, cérebro, etc.) com ação complementar ao SRA clássico conforme descrito em diversos estudos (DZAU, 1988; UNGER et al., 1991; DOSTAL, 1992). O SRA local pode exercer efeitos diretos sobre mecanismos regulatórios locais e estudos recentes têm atribuído a Angiotensina II propriedades pró-inflamatórias (WOLF; BUTZMANN; WENZEL, 2003) e de modulador da resposta imunológica agindo sobre citocinas, quimiocinas e moléculas de adesão, envolvendo mecanismos de crescimento celular, apoptose, fibrose e agindo também na diferenciação de monócitos em macrófagos (RUIZ-ORTEGA, 2001), conforme demonstrado na Figura 1.

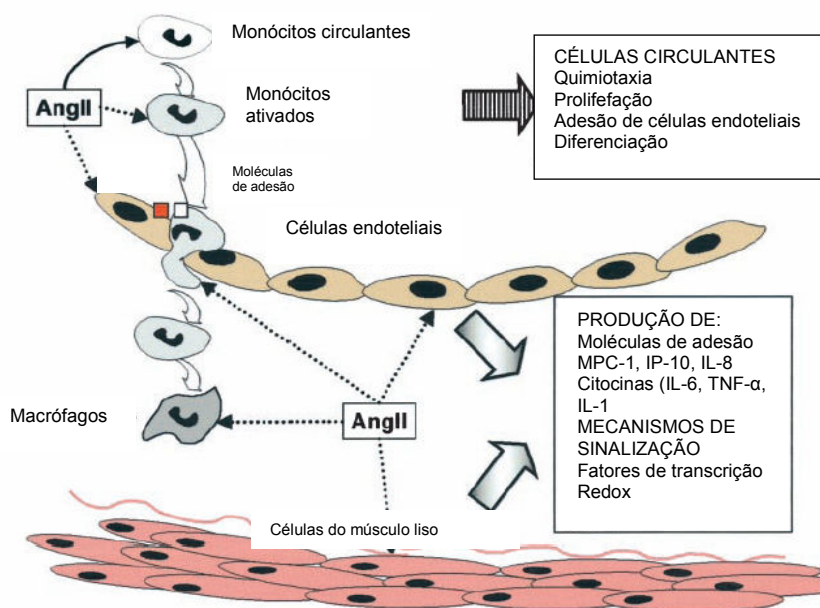


Figura 1. Propriedades pró-inflamatórias da Ang II e de modulação da resposta imunológica na injúria vascular, envolvendo mecanismos de quimiotaxia e proliferação celular e reações de oxidoredução

Fonte: Adaptado de Ruiz-Ortega, 2001.

2.1.1 Hipertensão renovascular experimental

Em virtude do caráter multifatorial da hipertensão arterial, sua indução experimental deve focar-se no objetivo do estudo a fim de se escolher o modelo mais adequado dentre os diversos descritos na literatura.

Os modelos de hipertensão experimental podem resultar de variados métodos, podendo ser de origem genética, neurogênica, de origem renal, dependente de mineralocorticóide, por inibição crônica do óxido nítrico, dentre outras, sendo o rato um modelo animal bastante utilizado, nesses diversos modelos (FAZAN JUNIOR et al., 2001).

Os modelos de hipertensão de origem renal podem ser:

- a) renovascular, decorrente de oclusão parcial da artéria renal;
- b) renopriva, decorrente de nefrectomia bilateral;
- c) perinefrítica, decorrente da indução de fibrose renal
- d) de origem renal produzida pela oclusão e desocclusão do pedículo renal.

Uma das técnicas mais utilizadas para indução da hipertensão renovascular foi descrito por Goldblatt et al. (1934), mostrando uma significativa elevação da pressão arterial em cães, que tiveram seu suprimento sanguíneo aos rins reduzido mediante estenose unilateral da artéria renal, por meio da colocação de um clipe de prata ao redor dessa. A este modelo foi dado o nome genérico de hipertensão de Goldblatt, sendo denominada 2R1C (dois rins um clipe) quando o rim contralateral é preservado ou 1R1C (um rim um clipe) quando remove-se o rim contralateral. Em geral, o aumento da pressão arterial se inicia poucos minutos após a redução do fluxo renal, atingindo um platô em duas a três semanas (FAZAN JUNIOR et al., 2001) e o grau de hipertensão em ambos os modelos é proporcional à constrição efetuada pelo clipe (CABRAL et al., 1997).

Segundo Freeman et al. (1979), a constrição da artéria renal seria o agente causal da hipertensão renal crônica e o aumento da atividade do sistema renina-angiotensina está associado com o início da hipertensão em ambos modelos, porém a manutenção do quadro hipertensivo no modelo 1R1C se dá principalmente pela sobrecarga de água e sódio, enquanto que no modelo 2R1C, o rim contralateral

excreta o excesso de sódio e a manutenção da hipertensão é em grande parte devida ao sistema renina-angiotensina-aldosterona.

Em ambos os modelos, há de se ressaltar a participação de outros mecanismos atuando de forma paralela na modulação da pressão arterial.

2.2 ETIOPATOGENIA DA DOENÇA PERIODONTAL

Embora a cavidade bucal humana seja colonizada por centenas de espécies diferentes de microorganismos, alguns dos quais potencialmente patógenos, existe em condições normais uma situação de equilíbrio entre as partes preservando-se assim a saúde periodontal do hospedeiro (GENCO, 1992 ; MORE; MOORE, 1994). A doença periodontal inflamatória é, portanto o resultado de um desequilíbrio na complexa interação entre hospedeiro e microorganismos presentes no biofilme dental, que colonizam a área supra e subgengival, promovendo inflamação dos tecidos de proteção (gingivite ou doença gengival induzida por placa bacteriana) e suporte (periodontite crônica) do dente, podendo levar a perda do mesmo.

As bactérias que inicialmente colonizam a superfície do dente são predominantemente microorganismos facultativos Gram-positivos, tais como *Actinomyces viscosus* e *Streptococcus sanguis* dispostos sob forma de biofilme bacteriano, porém à medida que aumenta o acúmulo do biofilme, este apresenta mudança em suas características, favorecendo a colonização por bactérias Gram-negativas anaeróbias como *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Campylobacter rectus*, dentre outras. A etiologia bacteriana das doenças periodontais, todavia é complexa, com uma grande variedade de microorganismos

responsáveis pelo início e progressão da doença (TROMBELLI; TATAKIS, 2003). Além disso, a natureza desses agentes patogênicos varia entre as diversas doenças, bem como entre os indivíduos e até entre diferentes sítios no mesmo indivíduo.

De uma maneira geral as espécies microbianas interagem, e embora algumas possam não ser patógenos periodontais, ainda influenciam o processo da doença favorecendo o seu crescimento ou aumentando o potencial de virulência de outros microrganismos (SOCRANSKY; HAFFAJEE, 1999)

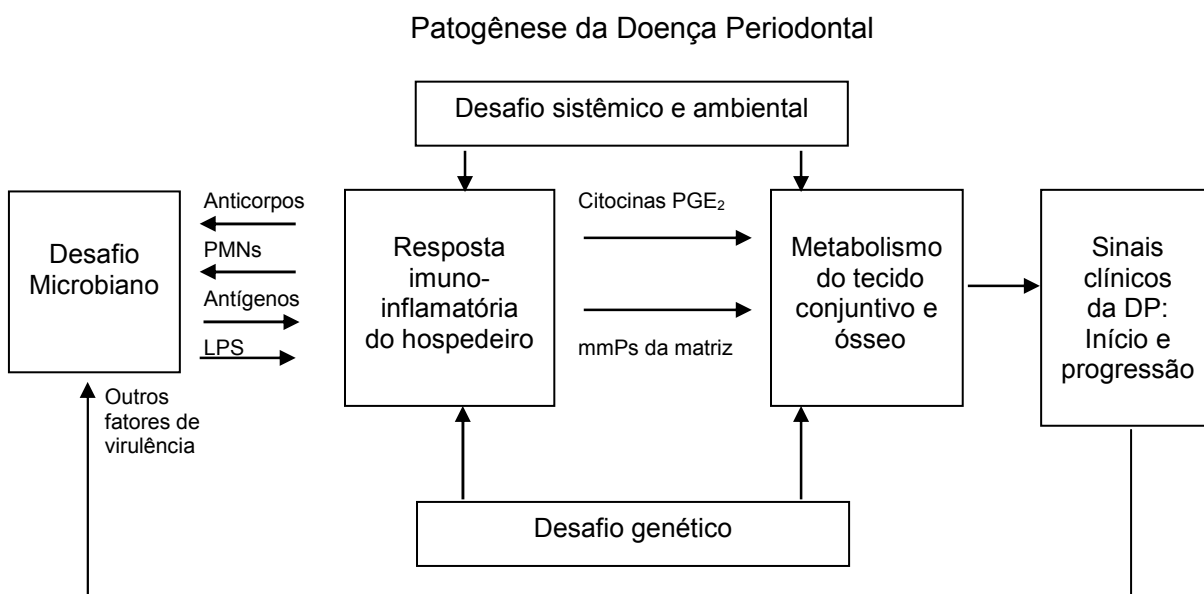
A presença de bactérias periodontopatógenas e seus produtos (enzimas proteolíticas e toxinas) no interior do sulco gengival podem deflagrar no hospedeiro uma resposta imune-inflamatória de intensidade tal que, caso não seja controlada pode levar à destruição do ligamento periodontal, perda da crista óssea alveolar, migração apical do epitélio juncional e formação de bolsas periodontais (LISTGARTEN, 1986). A liberação de enzimas proteolíticas e toxinas (lipopolissacarídeos) pelas bactérias no interior do sulco gengival são capazes de ativar células inflamatórias do tecido periodontal como os macrófagos para sintetizar e secretar uma variedade de moléculas como as citocinas (IL-1, TNF- α , IL-6), prostaglandinas (especialmente PgE₂), espécies reativas de oxigênio, e metaloproteinases que degradam os componentes da matriz extracelular, levando a perda do tecido conjuntivo de suporte e a reabsorção óssea.

O hospedeiro, portanto, ao ativar seu sistema de defesa contra os microorganismos agressores, acaba por também desempenhar um papel importante na patogênese da doença periodontal, uma vez que a ativação dessa cascata de eventos pode

resultar na destruição do tecido conjuntivo periodontal e reabsorção óssea alveolar (KINANE; LINDHE, 1999)

Dessa forma, conforme relatado por Genco (1992), embora a presença de bactérias seja essencial, não é o suficiente para causar a periodontite, e fatores relacionados ao hospedeiro de natureza genética, ambiental, além de determinadas condições sistêmicas, podem interferir na resposta do hospedeiro aos patógenos periodontais, influenciando a severidade da doença periodontal.

Os diversos fatores envolvidos na patogênese da doença periodontal estão esquematizados no Fluxograma 2.



Fluxograma 2. Modelo atual da Doença Periodontal (DP)
Fonte: adaptado de Page et al., 2000

2.2.1 Doença periodontal experimental

Embora o modelo animal mais fidedigno para o estudo da periodontite experimental seja o uso de primatas (WEINBERG; BRAL, 1999), por suas características anatômicas, histológicas e imunológicas semelhantes a dos humanos, a utilização de outras espécies como cães, porcos, felinos e roedores são freqüentes nesses estudos, sendo que os ratos (*Rattus norvegicus*) são mais amplamente utilizados, pelo fato de apresentarem vantagens como o porte reduzido, menor custo, facilidade de manipulação, e também apresentarem um grau de semelhança ao homem no que se refere à anatomia periodontal dos molares, microbiologia e patogênese da doença periodontal, o que justifica seu uso nesses estudos (KLAUSEN, 1991).

Os ratos são monofiodontes e apresentam um incisivo e três molares em cada quadrante, entretanto em virtude de suas características próprias os incisivos não são adequados ao estudo experimental da doença periodontal, pois além de apresentarem características morfológicas e histológicas distintas das encontradas em humanos, apresentam um processo de erupção contínua acentuado, em virtude da grande atrição decorrente da mastigação. Os molares por sua vez, estão dispostos em ordem decrescente de tamanho, e apresentam outras características estruturais semelhantes as nossas que os tornam bastante adequados ao estudo da doença periodontal, sendo frequentemente eleitos os primeiros molares, pela maior facilidade de acesso.

Page e Schroeder (1982) relataram a semelhança desses dentes aos dos humanos no que se refere à estrutura e organização dos tecidos periodontais, como epitélio oral, epitélio gengival sulcular, epitélio juncional, fibras periodontais colágenas,

cimento e osso alveolar, e uma diferença no que se refere ao epitélio sulcular do rato, que ao contrário dos humanos, apresenta-se queratinizado, porém isso não parece ser relevante (TAKATA et al., 1988).

Para induzir a doença periodontal experimental, diversos métodos têm sido empregados, quer isoladamente ou associados entre si. Dessa forma, a indução da doença periodontal experimental pode ser feita por manipulação dietética (OFFENBACHER et al., 1993); inoculação de patógenos periodontais (JORDAN et al., 1972), como o *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Fusobacterium nucleatum*, dentre outros; inoculação de toxinas bacterianas (LLAVANERAS et al., 1999; DUMITRESCU et al., 2004), ou ainda utilizando-se ligaduras posicionadas ao redor dos dentes (ROVIN, COSTICH; PERLSTEIN, 1966; PERSTEIN; BISSADA, 1977), podendo essa ser de algodão, seda, nylon, elástica ou metálica, com o objetivo de promover um acúmulo do biofilme bacteriano ocasionando uma irritação local e dando origem a processos inflamatórios bastante semelhantes aos observados na progressão da periodontite humana.

O método da ligadura é um dos mais utilizados, porém é importante ressaltar que além da irritação local promovida pela ligadura, a presença de microorganismos bucais é essencial para que ocorra a doença periodontal inflamatória, uma vez que, segundo Rovin (1966) não foi observada destruição periodontal como resposta a ligaduras colocadas em ratos *germ-free*.

A resposta do hospedeiro aos patógenos periodontais é que vai promover a destruição do tecido periodontal, em variados graus de acordo com o tempo do

estudo e ou associação com outros fatores sistêmicos ou locais, que podem exacerbar ou diminuir a resposta do hospedeiro, conforme demonstrado em diversos estudos (SANAVI et al., 1985; NOCITI JUNIOR, 2000).

Klausen (1991) relatou que as características histológicas e clínicas encontradas na doença periodontal induzida em ratos são similares as encontradas no homem e clinicamente observa-se sangramento gengival à sondagem suave decorridos poucos dias da indução da periodontite. As alterações microscópicas que ocorrem no epitélio juncional incluem formação de cristas epiteliais, ulceração e migração apical. Infiltrado inflamatório contendo linfócitos T e B, macrófagos e leucócitos polimorfonucleares (PMNs) aparecem no tecido conjuntivo subjacente, esses últimos migrando através do epitélio para dentro do sulco gengival (IRVING et al., 1974). Destruição de fibras colágenas e fibroblastos também ocorrem e a atividade osteoclástica aumenta resultando em perda óssea alveolar.

2.3 PERIODONTITE E SAÚDE SISTÊMICA

A inter-relação entre doenças bucais e sistêmicas tem sido relatada desde muito tempo, podendo a infecção focal dentária ser definida como a disseminação de microorganismos bucais para outros órgãos do corpo, sendo capaz de desenvolver doenças. Essa teoria da sepsia bucal iniciou um combate ao foco de infecção dentária de forma radical e descontrolada no início do século XX, acarretando mutilações dentárias de uma forma generalizada, inclusive de dentes sadios, onde se seguia à máxima de que a infecção focal dentária seria a origem de diversas mazelas sistêmicas e as extrações se justificavam para eliminar um possível foco infeccioso evitando-se a Odontologia conservadora em prol das exodontias.

Felizmente tal prática foi abandonada por falta de evidências científicas e o assunto relegado. Entretanto, no final do século XX a possibilidade da comprovação da inter-relação de doença bucal e sistêmica voltou à tona de maneira coerente em virtude dos avanços tecnológicos da investigação científica e tem ganhado destaque com o surgimento de um novo paradigma: a Medicina periodontal.

Diversos estudos (OFFENBACHER et al., 1996; SCANNAPIECO; MYLOTTE, 1999; TAYLOR, 2001) apontam evidências de que a doença periodontal pode influenciar a saúde geral e a susceptibilidade para determinadas doenças sistêmicas como um fator de risco. Dessa forma uma série de alterações sistêmicas como doenças respiratórias (SCANNAPIECO, 1996; MOJON, 2002), controle metabólico da diabetes (GROSSI; GENCO, 1998; MEALEY et al., 1999), doenças cardiovasculares (GENCO, 1997; KINANE, 2000), dentre outras, têm demonstrado uma possível associação com a presença de doença periodontal.

O mecanismo exato de como as doenças bucais afetam ou são afetadas por desequilíbrios na saúde geral do indivíduo ainda não está completamente esclarecido, mas existem evidências (FOURRIER et al., 1998) de que determinados fatores, como os altos níveis de citocinas e mediadores pró-inflamatórios que ocorrem durante a progressão da periodontite podem estimular a resposta sistêmica da fase aguda e induzir a complicações sistêmicas, além da possível influência direta de determinados patógenos provenientes do biofilme dental. Por outro lado, estudos (TAYLOR et al., 1998) apontam uma maior tendência de desenvolvimento e severidade de doença periodontal em determinadas condições sistêmicas como na diabetes por fatores decorrentes desta, como modificações na composição do biofilme bacteriano subgengival e alterações no metabolismo de fibras colágenas

favorecendo um maior comprometimento do tecido periodontal e perda óssea alveolar.

Em suma, a periodontite pode não somente atuar como fator de risco, mas também sofrer influências no estabelecimento de diversas alterações sistêmicas, porém, é importante ressaltar que a doença sistêmica pode ocorrer paralelamente à infecção bucal sem que haja relação direta de causa e efeito.

Portanto, reconhecendo-se a importância da hipertensão arterial no desenvolvimento de doenças cardiovasculares e sua relevância na saúde pública no Brasil, e considerando-se que na hipertensão renovascular os níveis de Angiotensina II encontram-se elevados, podendo esta agir como mediador inflamatório envolvendo mecanismos de quimiotaxia, proliferação celular e reações de oxidoredução, participando de importantes vias envolvidas no processo de inflamação local e perda óssea na periodontite, a questão que pretendemos abordar no presente trabalho é: A hipertensão renovascular exerce influência na periodontite experimental?

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Estudar os efeitos da hipertensão renovascular sobre a evolução da doença periodontal induzida em ratos (Wistar).

3.2.1 Objetivos específicos

- a) avaliar as alterações microscópicas que ocorrem no periodonto de ratos com hipertensão renovascular experimental, submetidos à indução da doença periodontal inflamatória;
- b) avaliar histometricamente a influência da hipertensão renovascular sobre a perda óssea alveolar na periodontite induzida nesses animais.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Escola Superior de Ciências da Saúde da Santa Casa de Misericórdia de Vitória (EMESCAM), Processo 014/2007, estando de acordo com as normas vigentes adotadas pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) (ANEXO A).

4.1 ANIMAIS

Foram utilizados onze ratos (*Ratus norvergicus albicans*, Wistar) jovens, com aproximadamente cinco semanas de idade e com peso corporal inicial entre 150 e 170g, provenientes do biotério do Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas (PPGCF) da Universidade Federal do Espírito Santo (UFES). Os animais foram mantidos em gaiolas individuais numa sala com controle de temperatura e ciclo de claro-escuro, sendo alimentados com água e ração *ad libitum*.

4.2 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Os animais foram aleatoriamente distribuídos em dois grupos experimentais

- a) Grupo I – SHAM (n=5);
- b) Grupo II - Hipertensos (n=6).

A seqüência experimental realizada neste trabalho encontra-se descrita no Quadro 1. Após cada procedimento os animais foram recolocados em suas respectivas gaiolas.

Período	Procedimento realizado
Dia zero	Separação aleatória dos grupos Pesagem dos animais Cirurgias: Grupo I- SHAM Grupo II- 2R1C
14° dia	Pesagem dos animais Indução da Doença Periodontal em todos os animais
27° dia	Pesagem dos animais Cateterização da artéria femoral e inspeção da ligadura
28° dia	Registros Hemodinâmicos e eutanásia

Quadro 1. Protocolo experimental

4.2.1 Anestesia

Antes de todos os procedimentos cirúrgicos os animais foram pesados e então anestesiados por meio de injeção intraperitoneal de hidrato de cloral a 10% na concentração de 40mg/100g de animal. Suplementação com 20% da dose inicial foi realizada nos casos onde essa não tenha sido suficiente.

Após pesagem e anestesia, os animais do Grupo II foram submetidos à cirurgia para indução da hipertensão conforme descrição a seguir.

4.2.2 Indução da hipertensão renovascular

Para obtenção da hipertensão renovascular, seguiu-se o modelo de hipertensão de Goldblatt tipo “dois rins um clipe” (2R1C), onde a estenose unilateral da artéria renal é obtida por meio da aplicação de um clipe de prata, mantendo-se o rim contralateral. Dessa forma, os animais do Grupo II, depois de anestesiados foram submetidos à tricotomia abdominal, sendo em seguida posicionados em decúbito

dorsal, com as patas fixadas à mesa operatória com fita adesiva. Foi feito anti-sepsia do campo operatório com solução de álcool iodado a 2% seguido de laparotomia mediana de aproximadamente quatro centímetros e afastamento das alças intestinais para exposição da aorta e ramos da artéria renal. A artéria renal esquerda foi então dissecada e recebeu um clipe de prata manufaturado medindo 4 x 2mm com espessura de 0,25mm e calibrado numa abertura de 0,2mm (diâmetro interno) conforme ilustrado na Figura 2. Após instalação do clipe a cavidade abdominal foi fechada por planos com sutura interna contínua realizada com fio de sutura *catgut* cromado n.º 3-0 (Somerville Ltda.) e sutura externa com fio de seda n.º 4-0 (Ethicon® – Johnson & Johnson). Esse procedimento inicial foi contato como dia zero conforme descrito no Quadro 1.

Os animais do Grupo I (SHAM) foram submetidos ao mesmo protocolo, com exceção da instalação do clipe de prata na artéria renal.

Todos os animais receberam profilaticamente dose única (1ml/kg) via intra-muscular do antibiótico enrofloxacina 2,5% (Flotril®) sendo recolocados em suas gaiolas e deixados em recuperação por um período de 14 dias, quando então foram submetidos à indução da doença periodontal.

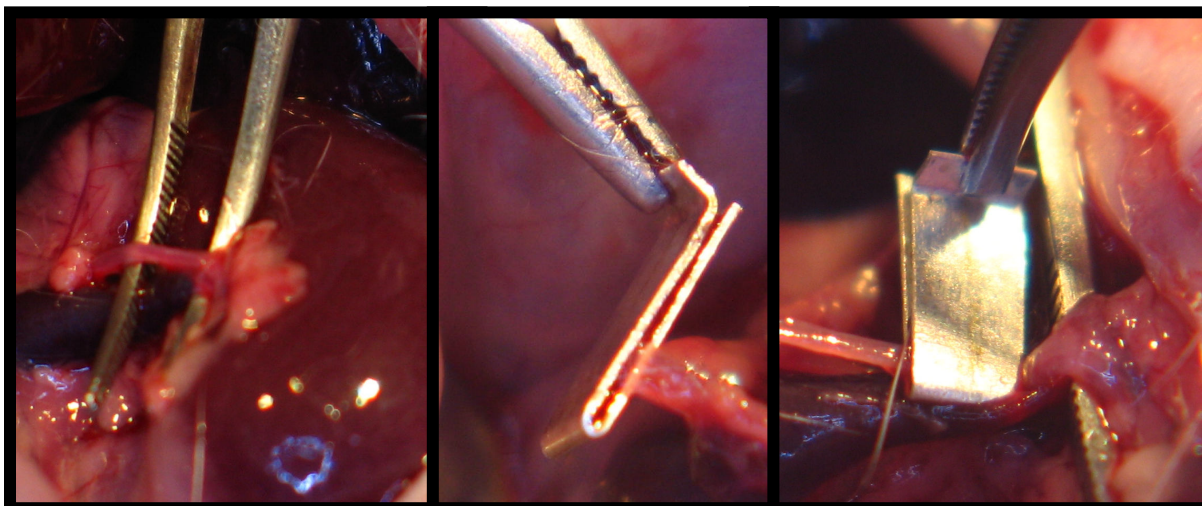


Figura 2. Artéria renal esquerda isolada e em seguida clipada para indução de hipertensão renovascular (2R1C)

Fonte: Fotografias de Fernando Vallim Silva Filho

4.2.3 Indução da doença periodontal inflamatória

No 14º dia pós-cirúrgico, todos os animais foram submetidos à indução da doença periodontal inflamatória, para isso, após serem anestesiados, os mesmos foram posicionados numa mesa operatória específica, conforme ilustrado na Figura 3, mantendo-se a boca aberta por meio de elásticos, facilitando o acesso aos molares inferiores.

Após avaliação clínica da mucosa gengival, uma lima endodôntica adaptada (cortada no limite entre sua parte ativa e sua parte lisa, e biselada na ponta) foi introduzida entre o primeiro e o segundo molar inferior esquerdo para promover um afastamento temporário e possibilitar a colocação da ligadura. Uma ligadura de algodão (linha Corrente® n.º 10, cor preta) foi então posicionada cervicalmente ao redor do primeiro molar inferior esquerdo e atada com um nó na face mesial, sendo a lima então removida. A ligadura foi então cuidadosamente inserida subgengivalmente (Figura 4) e deixada por um período de 14 dias a fim de propiciar

uma irritação local e favorecer o acúmulo de restos de alimentos e bactérias, induzindo a doença periodontal. O primeiro molar inferior direito, sem ligadura, serviu como controle.

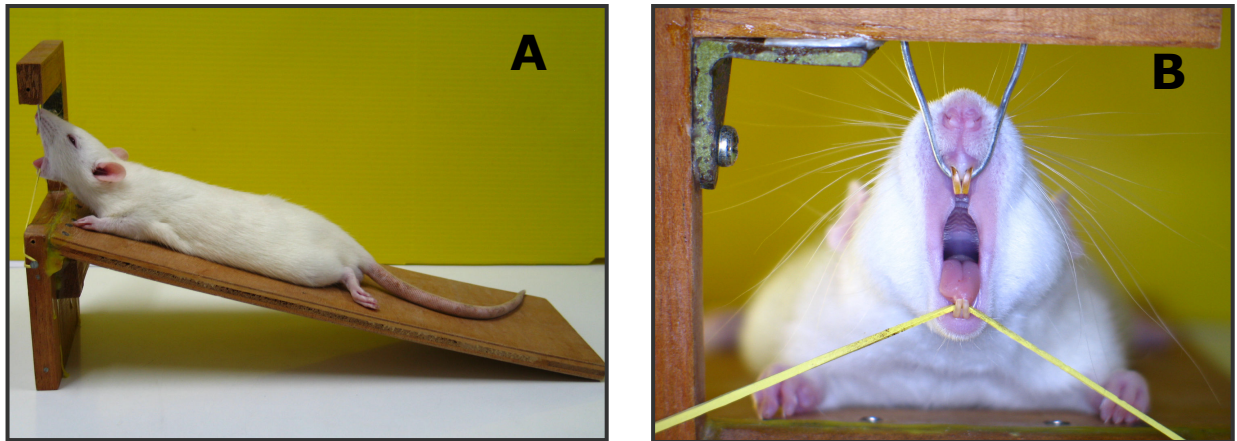


Figura 3. Animal anestesiado e posicionado em mesa operatória, facilitando o acesso à região de molares

Nota: A- Vista lateral; B- Vista frontal

Fonte: Fotografias de Fernando Vallim Silva Filho

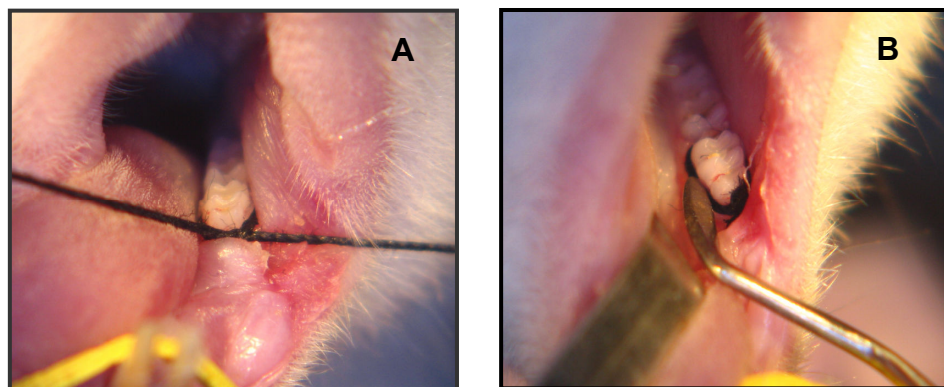


Figura 4. Ligadura instalada (A) e delicadamente inserida subgengivalmente para indução da doença periodontal inflamatória (B)

Fonte: Fotografia de Fernando Vallim Silva Filho

4.2.4 Cateterização da artéria femoral

No 27 dia (13º dia após a colocação da ligadura para indução da doença periodontal), os animais foram pesados, anestesiados e submetidos a cateterização da artéria femoral para obtenção dos registros de pressão arterial e frequência cardíaca.

A artéria femoral esquerda foi acessada por meio de incisão na região inguinal, e então cuidadosamente dissecada, isolada e preparada para receber um cateter de polietileno contendo salina heparinizada (40U/ml) e ocluído com pino de aço inoxidável. Para confecção do cateter de polietileno, utilizou-se dois diâmetros diferentes, sendo o menor diâmetro PE-10 com 5cm de comprimento (inserido na artéria) soldado a um diâmetro maior PE-90 com 15cm de comprimento (a ser conectado ao transdutor de pressão). Após o cateter ser introduzido e fixado à artéria femoral, utilizou-se um trocater que foi introduzido pela incisão feita na região inguinal e conduzido subcutaneamente pelo dorso até ser exteriorizado por uma pequena incisão na região mediocervical posterior do animal. A extremidade livre do cateter foi então conduzida no interior do trocater, sendo exteriorizado, em seguida o trocater foi removido e o cateter fixado nessa região por meio de sutura, de maneira tal que o animal não tivesse acesso ao mesmo.

Concluído esse procedimento, os animais ainda anestesiados foram posicionados na mesa operatória, com a boca aberta, para inspeção visual da ligadura, sendo em seguida recolocados em suas gaiolas individuais e deixados em recuperação por 24 horas. No dia seguinte foram então realizados os registros hemodinâmicos, conforme descrito a seguir.

4.2.5 Registros hemodinâmicos

Os registros hemodinâmicos foram realizados com o animal acordado em repouso, para isso, foi removido o pino de aço que ocluía a cânula (PE90) sendo a mesma conectada a um transdutor de pressão (Spectramed P23XL) acoplado a um sistema de aquisição de dados (MP100, BIOPAC Systems, Inc; CA), onde foram registradas a pressão arterial pulsátil (PAP), a pressão arterial média (PAM) e a frequência cardíaca (FC), utilizando-se um software específico (Acqknowledge for Windows 3.8.1).

4.3 PROCESSAMENTO DOS ESPÉCIMES

Após obtidos os registros hemodinâmicos, os animais foram sacrificados com uma superdosagem do anestésico tiopental sódico, sendo as mandíbulas removidas e divididas pela sínfise mandibular. As peças foram então imersas em uma solução fixadora de formol a 4% numa relação de 1:10 (volume de tecido/volume de solução fixadora) por um período de 48 horas. Depois de fixadas as peças foram lavadas em água corrente por doze horas para remoção do formol e então descalcificadas com EDTA 7% (pH 7,4) por um período de aproximadamente oito semanas, em temperatura ambiente, com troca da solução a cada três dias e agitação ocasional. A avaliação da descalcificação foi feita por meio de teste da penetração de uma agulha fina numa área não importante da peça.

Concluído o processo de descalcificação as peças foram reduzidas (aparadas), de maneira a englobar os três molares, e então proseguiu-se com os procedimentos laboratoriais de rotina, sendo as peças desidratadas numa série crescente de álcool

etílico a 70%, 80%, 90% (uma hora em cada concentração) e duas vezes no álcool absoluto, diafanizadas em xilol (dois banhos de uma hora cada) e embebidas em parafina fundida a 56°C (dois banhos de uma hora cada em estufa).

As peças foram incluídas em blocos de parafina, com a face vestibular dos dentes voltada para o plano de corte e secções seriadas de seis micrômetros (μm) de espessura no sentido mésio-distal foram obtidas, procurando seguir-se o longo eixo dos dentes.

Obtidos os cortes, os mesmos foram preparados para a coloração por hematoxilina e eosina (HE), sendo desparafinados com três banhos (5min cada) consecutivos de xilol, recebendo em seguida dois banhos em álcool absoluto (3min cada) e um banho (3min) em álcool hidratado (95%) e lavados em seguida por 10min. A coloração pela hematoxilina de Harris foi feita por seis minutos, lavando-se em seguida com água destilada para remoção do excesso de corante, diferenciando em álcool ácido (álcool 70° + HCL 1%), rapidamente, lavando em água corrente por dez minutos e corando pela eosina de Lison por três minutos, depois de lavar em água destilada rapidamente. A seqüência consta ainda de um banho em álcool 95% (3min) seguido por dois banhos de álcool absoluto (3min cada), clarificação por meio de três banhos de xilol de 3min cada e montagem das lâminas coradas utilizando-se “Bálsamo do Canadá”.

4.3.1 Análise microscópica

Para a análise microscópica foram selecionados cinco cortes histológicos de cada amostra de forma semi-seqüencial, dentre aqueles que melhor representassem a região interproximal média (mais centralizada), estando presentes o primeiro molar com as raízes mesial e distal e pelo menos a raiz mesial do segundo molar. Dos cinco cortes foi selecionado um aleatoriamente e então realizadas as avaliações na região interproximal distal do primeiro molar com relação aos seguintes parâmetros:

- a) número de vasos;
- b) contagem de neutrófilos, e
- c) perda óssea alveolar

As imagens foram obtidas utilizando-se um microscópio trinocular (Olympus AX -70) acoplado a uma câmara digital (VK-C150, Hitachi, Japan).

4.3.2 Análise histométrica

Para a análise histométrica foi realizada a captura da imagem, utilizando-se objetiva de 4x e um programa específico (Leica EWS 2100). Após a captura da imagem, com auxílio do programa de análise de imagens de domínio público Image J (desenvolvido por US National Institutes of Health e disponível em <http://rsb.info.nih.gov/ij/>) foi medida a distância linear (313 pixel = 1mm) da junção cimento-esmalte na raiz distal do primeiro molar inferior à crista óssea alveolar, conforme demonstrado na Figura 5.

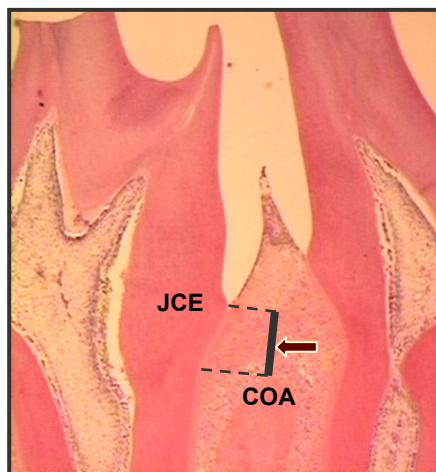


Figura 5. Avaliação histométrica da perda óssea alveolar na região interproximal distal ao primeiro molar inferior, medida linearmente da junção cimento-esmalte (JCE) a crista óssea alveolar

Nota: A seta indica o segmento a ser medido (coloração HE – aumento 4x)

4.3.3 Análise histopatológica

Os vasos sangüíneos foram contados utilizando-se objetiva de 20x na região interproximal distal ao primeiro molar, acima da crista óssea alveolar

A contagem de neutrófilos foi realizada de acordo com padrões adotados no Departamento de Patologia da FOB-USP. Para a captura de imagens foi utilizada uma câmara digital de alta resolução (Axiocam MRc, Zeiss), acoplada ao microscópio óptico binocular (Axio-pluss, Zeiss), com objetiva de 40x e um programa de aquisição e análise de imagens (Axiovision 4.5, Zeiss) instalado no computador conectado à câmera.

Cada campo microscópico capturado com essa objetiva corresponde a uma área previamente padronizada de $93.992,05\mu\text{m}^2$, sendo que devido ao pequeno tamanho da região analisada, no máximo dois campos foram utilizados para cada região. A

imagem visualizada apresenta um aumento original de 252x, sendo este valor obtido multiplicando-se o aumento da objetiva (40x) pelo aumento da ocular (10x) que acopla o microscópio a câmera (ANEXO B). Após capturadas as imagens, a contagem dos neutrófilos foi realizada utilizando-se o modo de exibição de tela inteira do computador para melhor visualização.

4.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todos os dados foram expressos como média \pm EPM.

A análise estatística foi realizada utilizando-se o teste *t* de Student para comparação em duas amostras pareadas ou independentes e análise de variância (ANOVA) de duas vias, seguida de *post hoc* de Tuckey.

As diferenças foram consideradas significantes quando $p < 0,05$.

5 RESULTADOS

As variações no peso corporal, pressão arterial e frequência cardíaca obtidas nos animais dos grupos SHAM e Hipertenso durante o protocolo experimental estão expressas nas tabelas a seguir.

5.1 PESO CORPORAL

Não houve variação significativa nos valores médios de peso corporal dos animais do grupo Hipertenso quando comparados aos animais do grupo SHAM durante as etapas de execução do protocolo experimental, conforme observado na Tabela 1.

Tabela 1. Valores médios de peso corporal nos animais do grupo SHAM e Hipertenso aferidos durante o protocolo experimental

Grupos	Peso (g)	Peso Inicial (g)	14 dias pós-cirurgia (g)	13 dias pós-ligadura (g)
SHAM (n=5)		151 ± 1,6	235 ± 5,7	288 ± 6,3
Hipertenso (n=6)		156 ± 1,95	223 ± 8,49	254 ± 15,77

Nota: os valores estão apresentados como média ± EPM. $p > 0,05$

5.2 PRESSÃO ARTERIAL E FREQUÊNCIA CARDÍACA

A Tabela 2 expressa a média dos valores basais de pressão arterial média (PAM) e de frequência cardíaca (FC) obtidos em cada grupo. Nota-se que, conforme esperado, os animais do grupo Hipertenso, submetidos à clipagem da artéria renal apresentaram aumento significativo dos níveis pressóricos quando comparados aos

animais do grupo SHAM ($178 \pm 5^*$ mmHg vs. $109 \pm 1,4$ mmHg, respectivamente).

Todavia os valores de frequência cardíaca não mostraram variação significativa entre os grupos SHAM e Hipertenso (351 ± 4 bpm vs. 370 ± 12 bpm, respectivamente).

Tabela 2. Valores médios de Pressão Arterial Média e Frequência Cardíaca (FC) nos animais do grupo SHAM e Hipertenso

Grupos	Parâmetros	Pressão Arterial (PAM) (mm Hg)	Frequência cardíaca (FC) (bpm)
SHAM (n=5)		$109 \pm 1,4$	351 ± 4
Hipertenso (n=6)		$178 \pm 5^*$	370 ± 12

Nota: os valores estão apresentados como média \pm EPM. $*p < 0,05$.

A análise macroscópica do rim clipado em animal do grupo Hipertenso mostra uma visível diferença no tamanho em relação ao rim não clipado, conforme observado na Figura 6.



Figura 6. Aspecto macroscópico do rim clipado (à direita) e não clipado (à esquerda) pertencentes a um mesmo animal do grupo Hipertenso
Fotos: Fotografias de Fernando Vallim Silva Filho

Registros típicos para valores de PAP, PAM e FC obtidos em animal do grupo SHAM e em animal do grupo Hipertenso estão expressos na Figura 7.

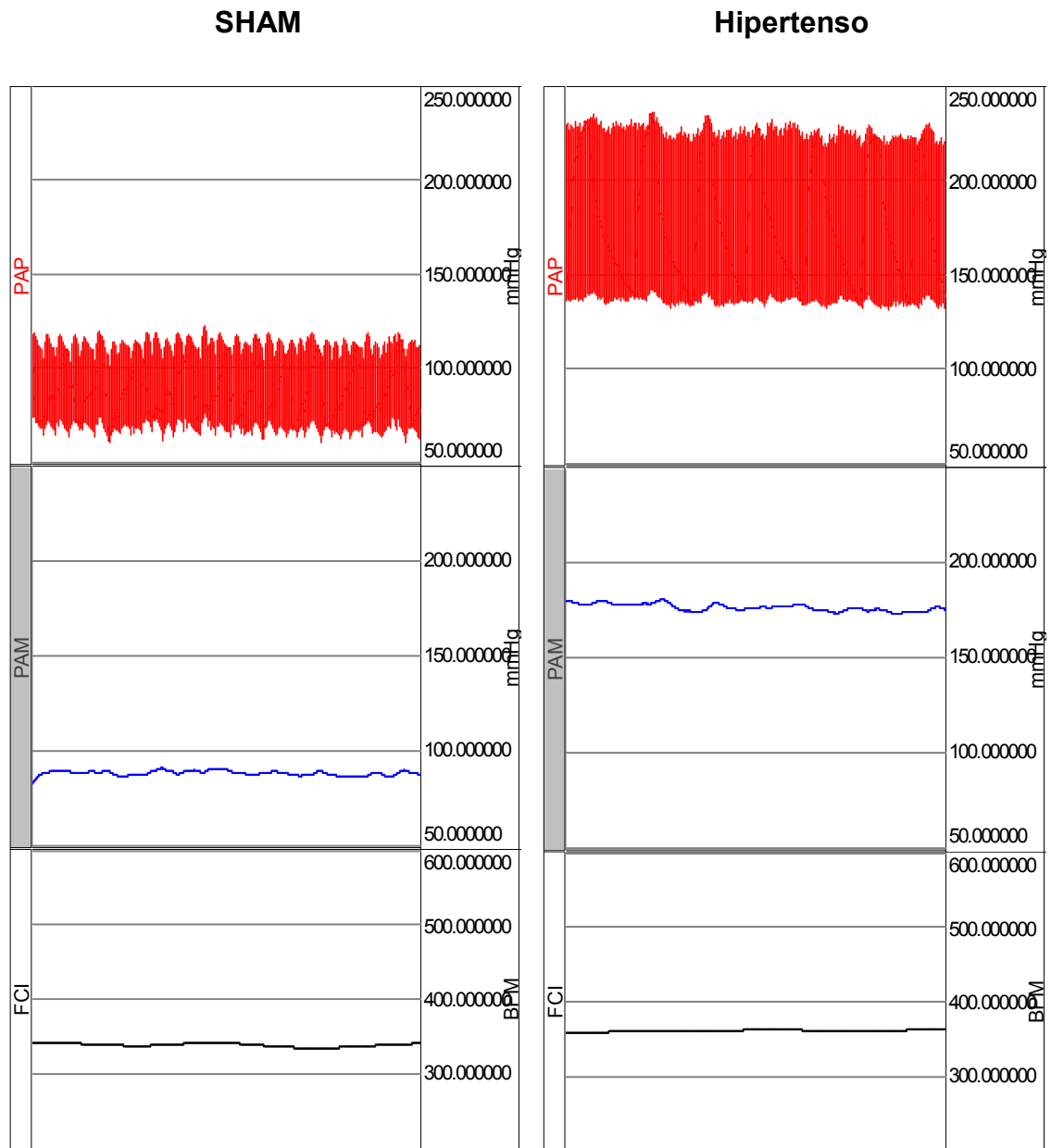


Figura 7.Registros típicos dos valores de PAP (mmHg), PAM (mmHg) e FC (BPM) em animal do grupo SHAM e do grupo Hipertenso após 28 dias

5.3 PERDA ÓSSEA ALVEOLAR

5.3.1 Aspecto macroscópico

Numa inspeção visual das peças logo após o processo de descalcificação podemos observar uma maior perda óssea na região interproximal distal do molar que recebeu a ligadura, quando comparado ao dente contra-lateral correspondente, do mesmo animal em ambos os grupos, conforme observado abaixo na Figura 8.

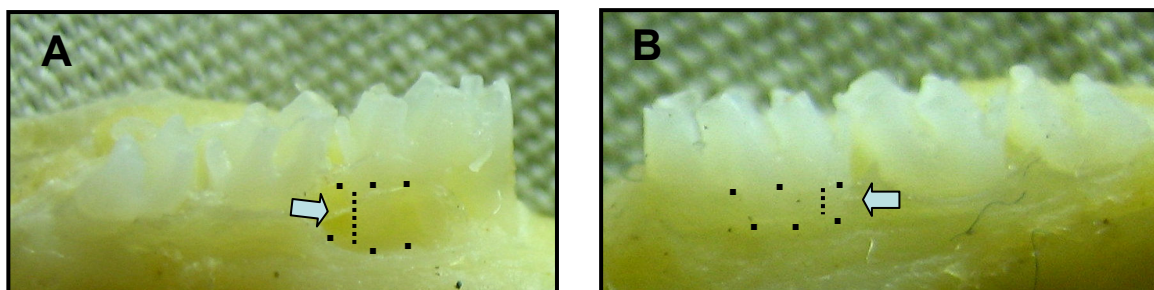


Figura 8. Aspecto macroscópico do molar que recebeu a ligadura (A) e seu homólogo contra-lateral sem ligadura (B), pertencente ao mesmo animal, após processo de descalcificação

Nota: as setas indicam a região interproximal distal e linha pontilhada a perda óssea correspondente

5.3.2 Avaliação microscópica

Na Figura 9 podemos observar a perda óssea alveolar representada pelo aumento da distância entre a junção cimento-esmalte (JCE) e a crista óssea alveolar (COA), na região interproximal distal do primeiro molar inferior nos lados sem e com ligadura nos animais do grupo SHAM e Hipertenso. Os valores médios de perda óssea encontrados no lado com ligadura foram significativamente maiores ($p < 0,05$) do que os obtidos no lado controle, tanto para o grupo SHAM ($0,74 \pm 0,07\text{mm}$ vs.

0,25±0,02mm, respectivamente), quanto para o grupo Hipertenso (0,87±0,10mm vs. 0,343±0,04mm, respectivamente).

Porém, na análise inter-grupos (Tabela 3, Gráfico 1) observamos apenas uma tendência ao aumento da perda óssea quando comparamos o lado ligado do grupo Hipertenso (0,87±0,10mm) ao lado correspondente do grupo SHAM (0,74±0,07mm).

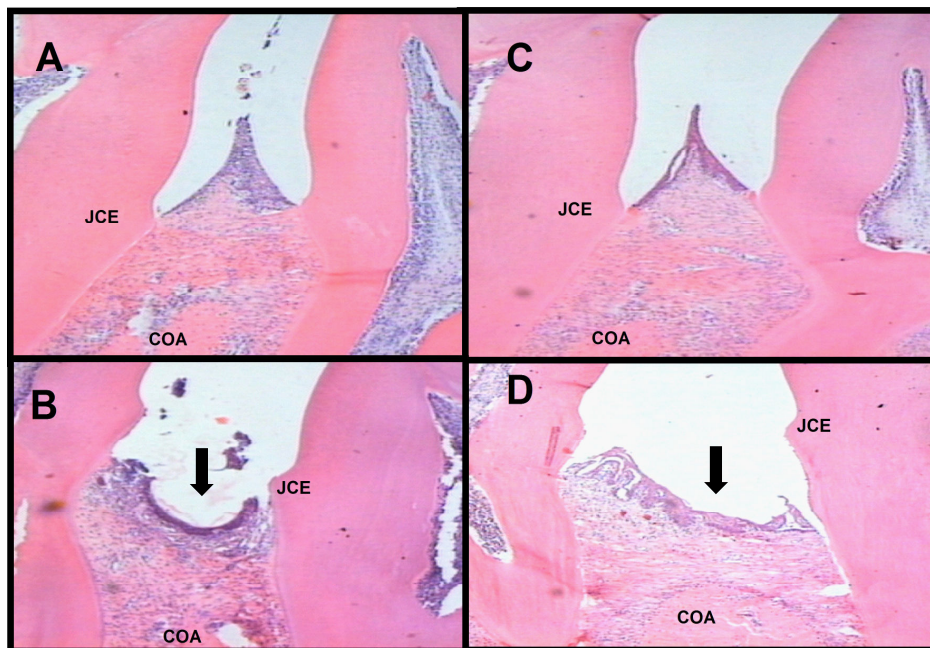


Figura 9. Região interproximal distal ao primeiro molar

Nota: observar a destruição tecidual e perda óssea característica (seta) quando comparamos o lado não ligado ao lado ligado nos animais do grupo SHAM (A e B respectivamente) e Hipertenso (C e D respectivamente). (Coloração HE Aumento original 10x)

Tabela 3. Valores médios de perda óssea alveolar e contagem de neutrófilos PMNs nos animais do grupo SHAM e Hipertenso

GRUPOS PARÂMETROS	SHAM (n=5)		Hipertenso (n=6)	
	Sem Ligadura	Com Ligadura	Sem Ligadura	Com Ligadura
JCE - COA (mm)	0,25±0,02	0,74±0,07	0,343±0,04	0,87±0,10
Número de Neutrófilos PMNs	2,2±0,3	14,6±2,2	2,3±0,3	15±0,9

Nota: os valores estão apresentados como média ± EPM. JCE – Junção Cimento-esmalte. COA – Crista óssea alveolar

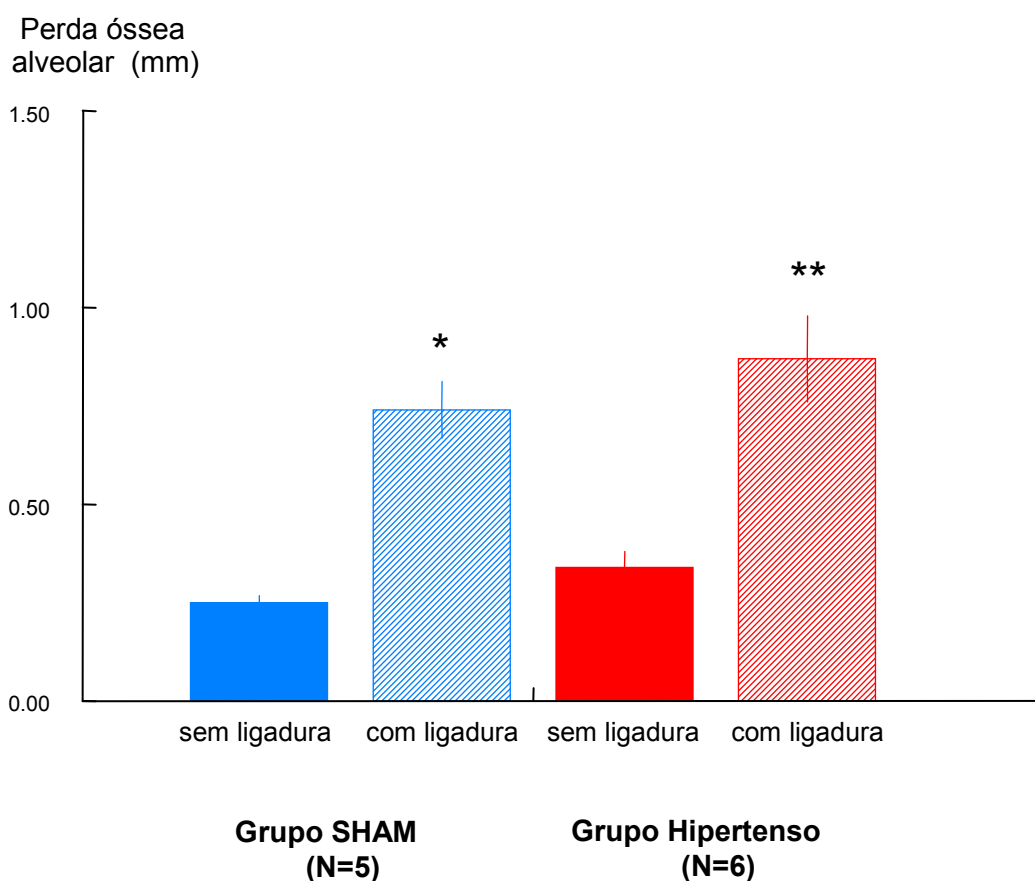


Gráfico 1. Gráficos representativos dos valores médios (em mm) de perda óssea alveolar (JCE-COA), nos animais dos grupos SHAM e Hipertenso.

Nota: Os valores estão apresentados como média ± EPM. **p<0,01 vs SHAM sem ligadura e Hipertenso sem ligadura; *p<0,05 vs SHAM sem ligadura e Hipertenso sem ligadura

5.4 ATIVIDADE INFLAMATÓRIA

A avaliação da atividade inflamatória, em relação número de neutrófilos encontrados na região interproximal distal (acima da crista óssea alveolar) do primeiro molar inferior, nos lados sem e com ligadura nos animais do grupo SHAM ($2,2 \pm 0,3$ vs. $14,6 \pm 2,2$, respectivamente) e Hipertenso ($2,3 \pm 0,3$ vs. $15 \pm 0,9$, respectivamente) está representada no Gráfico 2.

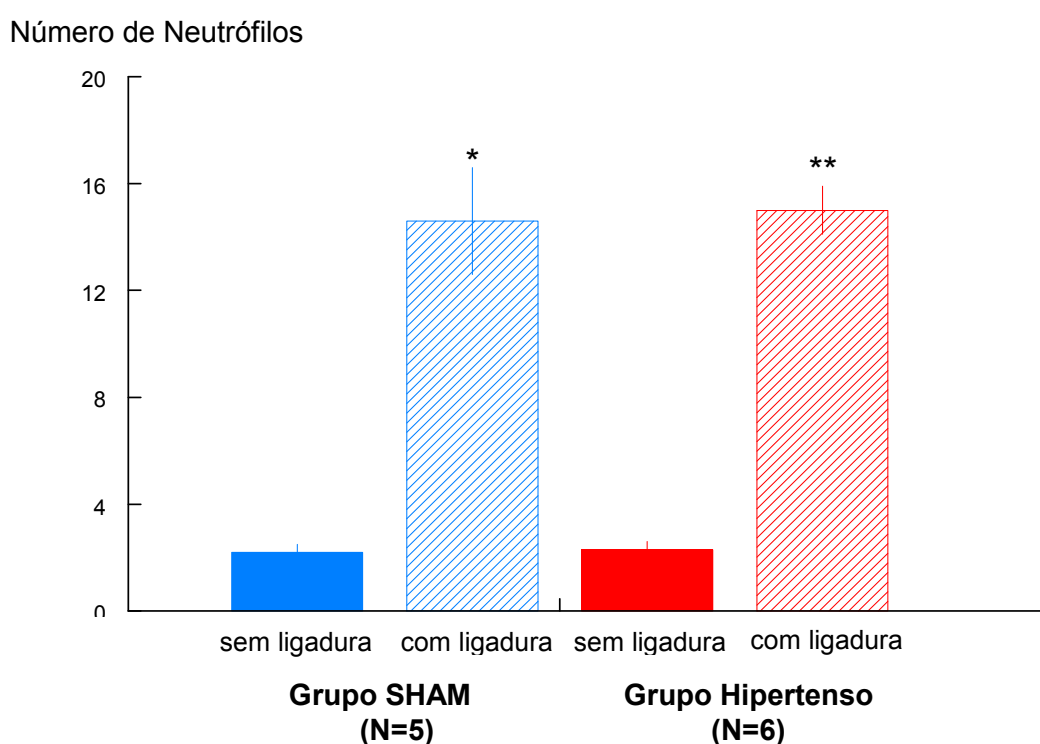


Gráfico 2. Gráficos representativos dos valores médios obtidos na contagem de neutrófilos da região interproximal distal do primeiro molar inferior de cada lado nos animais dos grupos SHAM e Hipertenso.

Nota: Os valores estão apresentados como média \pm EPM. ** $p < 0,01$ vs SHAM sem ligadura e Hipertenso sem ligadura; * $p < 0,05$ vs SHAM sem ligadura e Hipertenso sem ligadura

Pela análise deste gráfico observamos que embora haja uma diferença significativa intra-grupos, quando comparamos o lado ligado com o lado não ligado do mesmo animal, não encontramos diferenças significantes na análise inter-grupos correspondente.

5.5 AVALIAÇÃO QUANTITATIVA DE VASOS

A Gráfico 3 mostra a alteração vascular representada pelo número de vasos na região interproximal distal do primeiro molar inferior nos lados sem e com ligadura nos animais do grupo SHAM e Hipertenso. Dessa forma, podemos observar que o número de vasos obtido nos animais do grupo SHAM para os lados com periodontite ($13,1 \pm 1,7$) são significativamente ($p < 0,05$) maiores do que os valores encontrados no lado sem periodontite ($4,6 \pm 0,8$), o mesmo ocorrendo nos animais do grupo Hipertenso ($13,1 \pm 1,8$ no lado com periodontite e $4,5 \pm 0,4$ no lado sem periodontite), porém na análise inter-grupos esses valores não são significantes.

Número de vasos

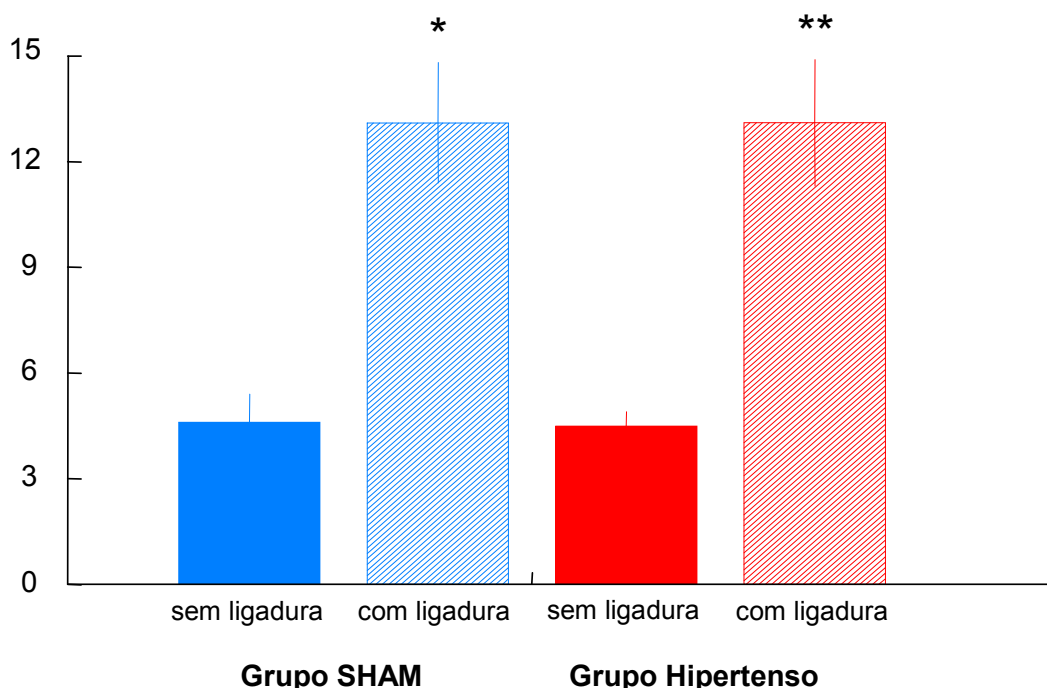


Gráfico 3. Gráficos representativos dos valores médios obtidos na contagem de vasos sangüíneos na região interproximal distal do primeiro molar inferior de cada lado nos animais dos grupos SHAM e Hipertenso

Nota: os valores estão apresentados como média \pm EPM; ** $p < 0,01$ vs SHAM sem ligadura e Hipertenso sem ligadura; * $p < 0,05$ vs SHAM sem ligadura e Hipertenso sem ligadura

6 DISCUSSÃO

Diversos estudos (BECK et al., 1998; HARASZTHY et al., 2000; KINANE; LOWE, 2000) sugeriram que a doença periodontal possui um papel importante no desenvolvimento da doença cardiovascular e possíveis mecanismos têm sido associados à presença de microorganismos periodontopatógenos, à resposta inflamatória, ou a ambos, porém a relação de causalidade permanece incerta.

Fatores de risco para doenças cardiovasculares, envolvendo liberação de catecolaminas séricas e atuando no sistema nervoso simpático como o estresse e o tabagismo, podem estar relacionados, por mecanismos diversos à doença periodontal (RIVERA-HIDALGO, 1986; TONETTI, 1998; NOCITI JUNIOR et al., 2000), e embora a hipertensão arterial seja também outro fator de risco relacionado às doenças cardiovasculares, podendo causar alterações vasculares no organismo como um todo, e envolvendo também a participação de catecolaminas séricas e ativação do sistema nervoso simpático poucos estudos têm avaliado os efeitos dessa no desenvolvimento da doença periodontal.

Recentes estudos têm sugerido a participação da periodontite como fator de risco para a hipertensão em mulheres com eclâmpsia (HERRERA et al., 2007) e na pós-menopausa (TAGUCHI et al., 2004), e embora estudos epidemiológicos tenham tentado estabelecer uma inter-relação entre doença periodontal e hipertensão nos últimos anos, os critérios avaliados em relação a periodontite variam de forma significativa, como número de dentes perdidos, perda de inserção óssea, densidade óssea alveolar, quantidade de bolsa, dentre outros, podendo levar a resultados diversos.

Völvek et al. (2006) estudaram 4.125 indivíduos adultos (2.150 mulheres) entre 20 e 79 anos em uma região da Pomerânia, não encontrando nenhuma relação entre números de dentes e hipertensão na população feminina, mas sugere uma associação inversa entre número de dentes e pressão arterial sistólica para os homens. Os autores sugerem a participação da doença periodontal como um elo entre as doenças vasculares e a perda de dentes, entretanto no que diz respeito à saúde oral os resultados desse estudo podem ter interpretações diversas, pois, além da perda do dente por doença periodontal, vários fatores podem estar envolvidos na ausência de dentes, tais como agenesias, extrações indicadas para correção ortodôntica, avulsão por traumatismo, e também a condição socioeconômica e nível cultural do paciente que muitas vezes opta pela exodontia e não pelo tratamento restaurador. Além disso, a amostra englobava indivíduos com fatores de risco comuns à hipertensão e a doenças periodontais que podem levar a perda dentária, como diabetes, tabagismo, e diferentes níveis socioeconômicos o que pode interferir nos resultados. Estudos de Tagushi et al. (2004) em mulheres na pós-menopausa também relacionaram hipertensão e número de dentes, sugerindo doença periodontal como possível causa da perda de dentes, e excluindo da amostra (formada por 67 mulheres com alguma perda de dente e 31 sem perda de dentes) histórico de trauma na mandíbula, tratamento ortodôntico, tabagismo, manifestações clínicas de arteriosclerose, desordens do fígado, injúria renal, uso de medicamentos que afetam a pressão arterial ou o metabolismo de lipídeos, e baixo nível de escolaridade. Os resultados indicaram uma diferença significativa com níveis mais baixos pressão diastólica no grupo sem perda dentária do que no grupo com perda dentária. Em relação à pressão sistólica verificou-se apenas uma tendência de níveis mais baixos para o grupo sem perda de dentes em relação às que

apresentavam alguma perda dentária. Embora o estudo enfoque hipertensão e perda de dentes de uma maneira geral e não a periodontite especificamente, podemos observar que alguns dos critérios de exclusão adotados pelos autores tendem a direcionar a perda dentária como sendo determinada pela doença periodontal.

Considerando-se as dificuldades observadas na interpretação de dados obtidos em estudos epidemiológicos inter-relacionando hipertensão e periodontite, e a carência de estudos dessa possível inter-relação na área experimental, o presente trabalho se propôs a estudar o efeito da hipertensão arterial na periodontite induzida em ratos, com um modelo animal renovascular, que se diferencia dos modelos até então empregados por envolver um animal hipertenso não geneticamente modificado. Isso é importante pois, embora tanto a hipertensão quanto a doença periodontal apresentem etiologia multifatorial, incluindo também fatores genéticos, os animais geneticamente modificados podem apresentar outras características inerentes à espécie, como uma maior vascularização, o que pode influenciar os resultados obtidos.

Outro parâmetro empregado na realização desse estudo, e de fundamental importância, é a equivalência dos animais não somente no que diz respeito ao peso corporal, mas também a idade, uma vez que se sabe que ratos apresentam uma erupção contínua dos molares num processo fisiológico, resultado da atrição dentária, o que não somente aumenta a distância da junção cimento-esmalte à crista óssea alveolar, como também promove uma remodelação óssea alveolar naturalmente com a idade. Desse modo, a distância entre a JCE e COA tende a aumentar por um processo fisiológico dependente da idade do animal (HOFFMAN;

SCHOUR, 1940), portanto o aumento da distância JCE-COA que ocorre durante a periodontite experimental decorrente da reabsorção da crista óssea alveolar é um processo patológico que ao ser avaliado em animais de idades diferentes pode comprometer os resultados obtidos. Além disso, no presente estudo, o controle intra-grupos também foi feito num mesmo animal, comparando-se o lado ligado ao contra-lateral não ligado.

A colocação da ligadura de algodão subgingivalmente, ao redor do primeiro molar inferior esquerdo com o objetivo de produzir irritação local e acúmulo de biofilme bacteriano, induzindo à periodontite conforme relatado por Johnson (1975) foi feita duas semanas após indução da hipertensão renovascular, ou seja, numa fase aguda da hipertensão com a ativação do sistema renina-angiotensina-aldosterona favorecendo, nos animais clipados, não somente a manutenção da hipertensão, mas também aos fenômenos vasculares proliferativos decorrentes dos efeitos da Ang II mediados pelos receptores AT_1 . As propriedades pró-inflamatórias da Ang II e de modulador da resposta imunológica poderiam nesta fase influenciar a periodontite agindo na ativação de células inflamatórias, no aumento do estresse oxidativo e na modificação do metabolismo de lipoproteínas, uma vez que a Ang II pode estimular as enzimas NADH e NADPH oxidase, importantes vias produtoras de O_2^- , e estudos de Ruiz-Ortega et al. (2001) demonstraram que em modelos animais, drogas que bloqueiam a ação da Ang II, como os inibidores da ECA ou antagonistas dos receptores AT_1 podem diminuir a resposta inflamatória. Outros estudos (LERMA et al., 2001) mostraram que modelos experimentais de hipertensão renovascular também apresentam aumento na biodisponibilidade de espécies reativas de oxigênio (ROS) tanto central quanto periféricamente. Por sua vez, Sobaniek et al. (2000) relataram o papel dos radicais livres e peróxidos na manutenção da homeostase

periodontal e mediação na formação de citocinas pró-inflamatórias podendo qualquer desequilíbrio neste mecanismo, levar à destruição de fibras colágenas e reabsorção do processo alveolar. Além disso, estudos de Castelli et al. (1978) avaliaram microscopicamente o ligamento periodontal de ratos com hipertensão renovascular 2R1C encontrando alterações nos vasos que suprem o periodonto.

A variação média no peso corporal dos animais de ambos os grupos mostrada na Tabela 1, nos indica que no decorrer do experimento houve ganho de peso após os procedimentos cirúrgicos para indução da hipertensão, assim como após a instalação das ligaduras, sugerindo que os animais não apresentaram dificuldades de alimentação após os referidos procedimentos, uma vez que a cicatrização das feridas cirúrgicas ocorreu normalmente sem complicações ou seqüelas.

Considerando-se hipertensão valores de pressão sistólica acima de 140mmHg, os animais submetidos a clipagem da artéria renal esquerda obtiveram média de pressão arterial acima desse valor ($178\text{mmHg} \pm 5$), indicando que a estenose promovida pelo clipe foi eficaz na indução da hipertensão em concordância com outros experimentos realizados em nosso laboratório.

A elevação da pressão arterial no modelo de hipertensão renovascular 2R1C em ratos pode ser observada já no primeiro dia em que se realiza a clipagem da artéria renal, em decorrência da redução do fluxo renal, sendo os níveis pressóricos dependentes do grau de estenose imposto pelo clipe, conforme descrito por Cabral, Vasquez e Mauad (1997). Tanto o estabelecimento quanto a manutenção da hipertensão nesse modelo 2R1C dependem principalmente da ativação do sistema renina-angiotensina, sendo o rim contralateral eficiente em promover a excreção da

sobrecarga de sódio imposta pelo rim clipado, o que previne o acúmulo de sódio e o aumento de volume.

Nos animais hipertensos foi notado visualmente uma diferença no tamanho dos rins (Figura 6), sendo o rim não clipado maior que o clipado, esse fato também está de acordo com outros trabalhos de nosso laboratório (PEREIRA, 2005), em que a diferença no tamanho dos rins pode ser justificada por uma hipertrofia do rim não clipado em decorrência da tentativa desse em reestabelecer uma excreção eletrolítica eficiente num mecanismo compensatório. Ao mesmo tempo, o rim clipado diminui seu tamanho por estar hipofuncionante.

A média dos valores obtidos na avaliação da frequência cardíaca (351 ± 4 bpm para os animais SHAM vs. 370 ± 12 bpm para os animais hipertensos) indica que os níveis de estresse em ambos os grupos não foi significativa, o que se torna uma informação importante uma vez que alguns estudos (LINDEN et al., 1996; GENCO et al., 1996) têm sugerido a participação do estresse como um indicativo de risco para a doença periodontal. É importante também ressaltar que o aumento da pressão arterial não foi acompanhado de aumento significativo de frequência cardíaca nos animais do grupo Hipertenso, o que pode nos indicar um prejuízo das funções de barorreflexo nesse modelo 2R1C em ratos, conforme relatado por Moyses et al. (1994). A maior amplitude de pulso observada no registro típico do animal hipertenso (Figura 7) quando comparado ao animal SHAM pode ser atribuída a hipertrofia cardíaca, decorrente da hipertensão arterial, entretanto esse dado não foi confirmado por não ser o objetivo deste estudo.

O período experimental de 14 dias para indução da periodontite está de acordo com os estudos de Kuhr et al. (2004) para observação das alterações histológicas características do tecido periodontal, uma vez que o referido autor relata perda de efetividade na ligadura devido ao remodelamento ósseo fisiológico que tenderia a afastá-la da região subgingival quando da utilização dessa por períodos acima de 15 dias. Sallay et al. (1982), usando ligaduras ao redor do segundo molar superior de ratos, observaram acúmulo de bactérias, inflamação e destruição óssea aos 9 e 14 dias após a colocação de ligaduras, e os achados histopatológicos desses autores incluem destruição óssea alveolar horizontal, seqüestro ósseo e leucocitose na corrente sangüínea periférica. Por sua vez Koide et al. (1995) utilizando ligadura de seda ao redor do segundo molar superior encontrou reabsorção óssea inicial da crista alveolar após três dias, com pouca atividade osteoclástica até 14 dias.

Em nossos experimentos, quando comparamos em um mesmo grupo os dados obtidos nos molares que receberam a ligadura de algodão ao molar contralateral podemos observar naqueles, alterações histológicas características da periodontite, tais como destruição da papila gengival na região interproximal distal, perda óssea alveolar caracterizada pelo aumento da distância JCE-COA ($0,25 \pm 0,02\text{mm}$ vs $0,74 \pm 0,07\text{mm}$ no grupo SHAM e $0,34 \pm 0,04\text{mm}$ vs. $0,87 \pm 0,11\text{mm}$ para o grupo Hipertenso), aumento no número de neutrófilos ($2,2 \pm 0,3$ vs., $14,6 \pm 2,2$ para o grupo SHAM e $2,3 \pm 0,3$ vs. $15 \pm 0,9$ no grupo Hipertenso) e maior número de vasos sangüíneos ($4,6 \pm 0,8$ vs $13,1 \pm 1,7$ para o grupo SHAM e $4,5 \pm 0,4$ vs. $13,1 \pm 1,8$ no grupo Hipertenso), comprovando a eficácia desse método.

O aumento no número de neutrófilos observado neste estudo e corroborado por estudos anteriores em ratos é característico da resposta aguda e um fator

contrastante com a periodontite observada em humanos, que é uma doença crônica em que ocorre predominância de linfócitos e plasmócitos. Embora essa diferença no infiltrado predominante da periodontite entre ratos e humanos possa ser um dado importante, o que nos impossibilitaria transpor fielmente os resultados obtidos, esse modelo animal continua sendo amplamente utilizado em pesquisas semelhantes por motivos previamente mencionados. Estudos recentes (LEITE et al., 2005) com ratos espontaneamente hipertensos (SHR) submetidos à periodontite experimental por meio de ligadura de algodão ao redor do primeiro molar inferior, mostraram após sete dias aumento significativo no número de neutrófilos e osteoclastos na região interproximal distal ao dente ligado quando comparados aos animais do grupo controle (Wistar).

No presente trabalho, embora na análise intra-grupos tenhamos observado aumento significativo no número de vasos no lado com ligadura de todos os animais, quando comparado ao lado sem ligadura, não foi encontrado uma alteração significativa na análise inter-grupos. Assim o aumento no número de vasos parece ser devido a remodelação vascular ocasionada pela inflamação em ambos os grupos, não sendo influenciado diretamente pela hipertensão renovascular, como poderia ser esperado, uma vez que a Angiotensina II (Ang II) pode favorecer fenômenos de angiogênese mediados pelo receptores AT1 nos animais do grupo Hipertenso. Dessa forma, o aumento do número de vasos parece ser não em decorrência da ação da Ang II, mas sim resultado da formação de tortuosos *loopings* em vasos já existentes, e que ocorre nas periodontites experimentais em diversos modelos animais, incluindo ratos, conforme descrito por Zoellner et al. (2002).

Embora alguns trabalhos anteriores possam ter sugerido correlação positiva entre hipertensão e periodontite tanto em estudos clínicos, como o descrito por Arefeva (1966), com 297 pacientes hipertensos, divididos por faixa etária (18-30, 31-50 e 51-70 anos), em que constatou que esses apresentavam não somente frequência maior de doença periodontal, mas também de maior gravidade em relação ao controle em todas as faixas etárias pesquisadas; e em recentes estudos experimentais de Leite et al. (2005) que observaram agravamento da periodontite experimental em animais hipertensos (SHR) após o período de sete dias, quando comparados ao controle (Wistar), outros estudos não estão de acordo. Amar et al. (2003) em um estudo clínico sobre periodontite e disfunção endotelial, encontrou apenas uma tendência a elevação da pressão arterial no grupo com doença periodontal ($n=26$) em relação ao seu controle ($n=29$) com valores médios de pressão arterial sistólica de $123\text{mmHg} \pm 12$ nos indivíduos com periodontite vs. $116\text{mmHg} \pm 14$ para o grupo controle ($p>0,05$) e de pressão diastólica de $72\text{mmHg} \pm 11$ vs. $71\text{mmHg} \pm 8$ ($p>0,05$), respectivamente.

No nosso estudo experimental, os dados encontrados nos permitem inferir que no período estudado, a hipertensão renovascular não influenciou de maneira significativa a periodontite induzida em ratos, o que parece estar de acordo com o estudo experimental de Perlstein e Bissada (1977) que avaliaram a estrutura periodontal de ratos espontaneamente hipertensos, obesos (Zucker), e espontaneamente obesos hipertensos (Koletsky), comparados com grupo controle (Sprague-Dawley), com idade entre quatro a seis meses, submetidos à periodontite experimental por meio de ligadura metálica ao redor do segundo molar superior por um período de sete semanas. Os autores, após avaliação histométrica da posição do epitélio juncional, número de células inflamatórias e nível ósseo alveolar,

concluíram que, tanto os animais hipertensos quanto os obesos-hipertensos apresentaram alterações vasculares no periodonto e, embora a hipertensão sozinha não tenha contribuído significativamente na gravidade da doença periodontal, o grupo obeso-hipertenso obteve uma resposta periodontal mais intensa que os demais.

Diante do exposto, podemos enfim concluir que em ratos, no período que se desenvolveu a doença periodontal, ou seja, a partir do 14° ao 28° dia após a clipagem da artéria renal, a hipertensão renovascular não promoveu alterações significativas no número de neutrófilos, vascularização e perda óssea alveolar decorrentes da periodontite, o que pode ser atribuído aos níveis de angiotensina, que talvez não tenham sido suficientes para promover alterações significativas que afetem a gravidade da doença periodontal nesses animais, ou ainda ao fato de que hipertensão renovascular e doença periodontal podem coexistir sem que haja necessariamente uma relação de causa efeito entre elas.

7 CONCLUSÃO

A hipertensão renovascular, por si só não foi capaz de aumentar a perda óssea alveolar na periodontite induzida em ratos no período estudado, contudo são necessários maiores estudos, variando-se diversos fatores como tempo de indução da hipertensão e ou da periodontite, uso de técnicas de biologia molecular em complementação as técnicas histológicas, dentre outros para que se possa enfim afirmar os critérios de inclusão ou exclusão da hipertensão como fator de risco para doenças periodontais.

8 REFERÊNCIAS

AGUILERA, G. The renin angiotensin system and the stress response. **Ann. NY Acad. Sci.**, New York, v. 771, p. 173-186, 1995.

AMAR, S. et al. Periodontal disease is associated with brachial artery endothelial dysfunction and systemic inflammation. **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.**, Dallas, v. 23, p. 1245-1249, 2003.

AREFEVA, C. A. Changes of periodontium in hypertension. **Stomatologiia**, Moskva, v. 45, n.3, p. 45-48, May/June 1966.

BECK, J. D. et al. Periodontitis: a risk factor for coronary heart disease? **Ann. Periodontol.**, Chicago, v. 3, p. 127-141, 1998.

BERTOLOTTO, L. A et al. Hipertensão renovascular e hipertensão maligna: aspectos atuais. **Rev. Soc. Cardiol. Estado de São Paulo**, São Paulo, v. 13, n. 1, p. 130-147, jan./fev. 2003

CABRAL, A. M.; VASQUEZ, E.C.; MAUAD, H. Hipertensão experimental: Aspectos Fisiopatológicos e Técnicas de Produção. In: AMODEO, C.; LIMA, E.G.; VASQUEZ, E. C. (Org.). **Hipertensão arterial**. São Paulo: Sarvier, 1997. p. 61-71.

CASTELLI, W.A. et al. Effect of renovascular hypertension on the morphology of oral blood vessels **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol.**, Saint Louis, v. 46, n. 4, p. 576-582, 1978.

DOBRIAN, A. D.; SCRIEVER, S. D.; PREWITT, R. L. Role of Angiotensine II and free radicals in blood pressure regulation in a rat model of renal hypertension. **Hypertension**, Dallas, v. 38, p. 361-366, 2001.

DOSTAL, D. E. et al. Intra-cardiac detection of angiotensinogen and renin: a localized renin-angiotensin system in neonatal rat heart. **Am. J. Physiol.**, Bethesda, v. 263, p. C838-850, 1992.

DUMITRESCU, A. L. et al. A model of periodontitis in the rat: effect of lipopolysaccharide on bone resorption, osteoclast activity, and local peptidergic innervation. **J. Clin. Periodontol.**, Copenhagen, v. 31, n. 8, p. 596-603, Aug. 2004

DUSTAN, H. P. Renal arterial disease and hypertension. **Med. Clin. North Am.**, Philadelphia, v. 81, n. 5, p. 1199-1212, 1997.

DZAU, V. J. Circulating versus local renin-angiotensin system in cardiovascular homeostasis. **Circulation**, Dallas, v. 77, p. 14-13, 1988.

FAZAN JÚNIOR, R. et al. Modelos de hipertensão arterial. **Rev. Bras. Hipertens.**, Ribeirão Preto, v. 8, n. 1, p. 19-29, 2001.

FILIPPO, R. et al. Hipertensão renovascular. **Rev. angiol. cir. vasc.**, Rio de Janeiro, v. 9, n. 2, 2000. Disponível em: <<http://www.sbacvrj.com.br/paginas/revistas/sbacvrj/2000/3/Revisaop97.htm>>. Acesso em: 26 abr. 2007.

FOURRIER, F. et al. Colonization of dental plaque: a source of nosocomial infections in intensive Care Unit patients. **Crit. Care med.**, New York, v. 26, n. 2, p. 301-308, 1998.

FREEMAN, R. H. et al. Effects of continuous converting enzyme blockade on renovascular hypertension in the rat. **Am. J. Physiol.**, Bethesda, v. 236, n. 1, p. F21-4, 1979.

GENCO, R. J. Host responses in periodontal disease: current concepts. **J. Periodontol.**, Chicago, v. 634, Suppl. 4, p. 338-355, 1992.

GENCO, R. J. Current view of risk factors for periodontal diseases. **J. Periodontol.**, Chicago, v. 67, Suppl 10, p. 1041-1049, 1996.

GENCO, R. J. et al. Periodontal disease is a predictor of cardiovascular disease in a Native American population. **J. Dent. Res.**, Washington, v. 76, Special Issue, p. 408, 1997. (Abstract 3158).

GENCO, R. J. et al. Relationship of stress, distress, and inadequate coping behavior to periodontal disease. **J. Periodontol.**, Chicago, v. 70, p. 711-723, 1999.

GOLDBLATT, H. et al. The production of persistent elevation of systolic blood pressure by means of renal ischemia. **J. Exp. Med.**, New York, v. 59, p. 347-381, 1934.

GROSSI, S.G.; GENCO, R.J. Periodontal disease and diabetes mellitus: a two way relationship. **Ann. Periodontol.**, Chicago, v. 3, n. 1, p. 51-61, July 1998.

HARASZTHY, V. I. et al. Identification of periodontal pathogens in atheromatous plaques. **J. Periodontol.**, Chicago, v. 71, n. 10, p. 1554-1560, Oct. 2000.

HERRERA, J. A. et al. Periodontal disease severity is related to high levels of C-reactive protein in pre-eclampsia. **J. Hipertens.**, London, v. 25, n. 7, p. 1459-1464, 2007.

HOFFMAN, M. M.; SCHOUR, I. Quantitative studies in the development of the rat molar. II. Alveolar bone, cementum and eruption. **Am. J. Orthod.**, Saint Louis, v. 26, p. 854-874, 1940.

IRVING, J. T. et al. Histological changes in experimental periodontal disease in gnotobiotic rats and conventional hamsters. **J. Periodontal Res.**, Copenhagen, v. 9, n. 2, p. 73-80, 1974.

JOHNSON, J. H. Effects of local irritation and dextran and sufat administration on the periodontium of the rat. **J. Periodontal. Res.**, Copenhagen, v. 10, p. 332-345, 1975.

JORDAN, H.V.; KEYS, P.H. et al. Periodontal lesions in hamsters and gnotobiotic rats infected with actinomyces of human origin. **J. Periodontal Res.**, Copenhagen, v. 7, n. 1, p. 21-28, 1972.

KINANE, D. F.; LOWE, G. How periodontal disease may contribute to cardiovascular disease. **Periodontol.**, Chicago, v. 23, p. 121-126, 2000.

KINANE, D.F.; LINDHE, J. Patogênese da periodontite. In: LINDHE, J. (Ed.). **Tratado de periodontia clínica e implantologia oral**. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999. cap. 5, p. 127-152.

KLAUSEN, B. Microbiological and immunological aspects of experimental periodontal disease in rats: a review article. **J. Periodontol.**, Chicago, v. 62, n. 1, p. 59-73, 1991.

KOIDE, M. et al. In vivo administration of IL-1 beta accelerator silk ligature-induced alveolar bone resorption in rats. **J. Oral Pathol. Med.**, Copenhagen, v. 24, n. 9, p. 420-434, 1995.

KUHR, A. et al. Observations on experimental marginal periodontitis in rats. **J. Periodontal Res.**, Copenhagen, v. 39, n. 2, p. 101-106, Apr. 2004.

LEITE, C.L. et al. Experimental-induced periodontitis is exacerbated in spontaneously hypertensive rats. **Clin. Exp. Hypertens.**, New York, v. 27, p. 523-531, 2005.

LERMA, L.O. et al. Increased oxidative stress in experimental renovascular hypertension. **Hypertension**, Dallas, v. 37, n. 2, p. 541-546, 2001.

LINDEN, G.J.; MULLAY, B.H.; FREEMAN, R. Stress and the progression of periodontal disease. **J. Clin. Periodontol.**, Copenhagen, v. 23, p. 675-680, 1996.

SOCRANSKY, S. S.; HAFFAJEE, A. D. Microbiologia da doença periodontal. In: LINDHE, J. (Ed.). **Tratado de periodontia clínica e implantodontia oral**. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999. cap. 4, p. 92-126.

LISTGARTEN, M. A. Pathogenesis of periodontitis. **J. Clin. Periodontol.**, Copenhagen, v. 13, n. 5, p. 418-430, 1986.

LLAVANERAS, A. et al. CMT-8/clodronate combination therapy synergistically inhibits alveolar bone loss in LPS-induced periodontitis. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, New York, v. 878, p. 671-674, 1999.

MEALEY, B. et al. Diabetes and periodontal diseases. **J. Periodontol.**, Chicago, v.70, p.935-949, 1999.

MOJON, P. Oral health and respiratory infection. **J. Can. Dent. Assoc.**, Ottawa, v. 68, p. 340-345, 2002.

MOORE, W. E.; MOORE, L.V. The bacteria of periodontal diseases. **Periodontol. 2000**, Copenhagen, v. 5, p. 66-77, June 1994.

MOYSES, M. R. et al. Sigmoidal curve-fitting of baroreceptor sensitivity renovascular 2K1R hypertensive rats. **Braz. J Med. Biol. Res.**, Ribeirão Preto, v. 27, p. 1419-1424, 1994.

NOCITI JÚNIOR, F. H. et al. The influence of nicotine on the bone loss rate in ligature-induced periodontitis. A histometric study in rats. **J. Periodontol.**, Chicago, v. 71, n. 9, p. 1460-1464, Sept. 2000.

OFFENBACHER, S. et al. New clinical diagnostic strategies based on pathogenesis of disease. **J. Periodontal. Res.**, Copenhagen, v. 28, n. 6, Pt 2, p. 523-535, Nov. 1993

OFFENBACHER, S. et al. Periodontal infection as a possible risk factor for preterm low birth weight. **J. Periodontol.**, Chicago, v. 67, p. 1103-1113, 1996.

PAGE, I.H. The mosaic theory of arterial hypertension-its interpretation. **Perspect. Biol. Med.**, Chicago, v. 10, n. 3, p. 325-333, 1967.

PAGE, R. C. et al. Advances in the pathogenesis of periodontitis: summary of developments, clinical implications and future directions. **Periodontology 2000**, Copenhagen, n.14, p. 216-248, 1997.

PAGE, R. C.; SCHROEDER, H. E. **Periodontitis in man and other animals**. A comparative review. Basel: Karger, 1982.

PEREIRA, T. M. C. **Angiotensina II intra-renal modula a expressão da óxido nítrico sintase neuronal na hipertensão renovascular 2R1C**. 2005. Dissertação (Mestrado em Ciências Fisiológicas) - Centro Biomédico, Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, 2005.

PERLSTEIN, M. I.; BISSADA, N. F. Influence of obesity and hypertension on the severity of periodontitis in rats. **Oral Surg, Oral Med, Oral Pathol, Oral Radiol Endod**, Saint Louis, v. 43, n. 5, p. 707-719, May 1977.

RIVERA-HIDALGO F. Smoking and periodontal disease. A review of literature. **J. Periodontol.**, Chicago, v. 57, p. 617-624, 1986

ROVIN, S.; COSTICH, E.R.; GORDON, H.A. The influence of bacteria and irritation in the initiation of periodontal disease in germfree and conventional rats. **J. Periodontal Res.**, Copenhagen, v. 1, n. 3, p. 193-204, 1966.

RUIZ-ORTEGA, M. et al. Role of the renin-angiotensin system in vascular diseases-expanding the field. **Hypertension**, Dallas, v. 38, p.1382-1387, 2001.

SALLAY, K. et al., Alveolar bone destruction in the immunosuppressed rat. **J. Periodontal Res.**, Copenhagen, v. 17, n. 3, p. 263-274, 1982.

SANAVI, F. et al. The colonization and establishment of invading bacteria in periodontium of ligature-treated immunosuppressed rats. **J. Periodontol.**, Chicago, v. 56, n. 5, p.273-280, May 1985.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE HIPERTENSÃO. V Diretrizes brasileiras de hipertensão arterial. Campos do Jordão, São Paulo, 2006. Disponível em: <<http://www.sbh.org.br/documentos/index.asp>>. Acesso em: 27 maio 2007.

SCANNAPIECO FA, MYLOTTE JM. Relationships between periodontal disease and bacterial pneumonia. **J Periodontol.**, Chicago, v. 67, p. 1144-1122, 1996.

SCANNAPIECO, F. A.; GENCO, R. J. Association of periodontal infections with atherosclerotic and pulmonary diseases. **J. Periodont. Res.**, Copenhagen, v. 34, n. 7, p. 340-345, June 1999.

SOBANIEC, H. et al. Morphological examinations of hard tissues of paradontium and evaluation of selected processes of lipid peroxidation in blood serum of rats in the course of experimental periodontitis. **Med. Sci. Monit.**, Warsaw, v. 6, n. 5, p. 875-881, 2000.

TAGUCHI, A, et al. Tooth loss is associated with an increased risk of hypertension in postmenopausal women. **Hypertension**, Dallas, v. 43, p. 1297-1300, 2004.

TAKATA, T. et al. Penetration and uptake of colloidal goldlabeled concanavalin A in the junctional epithelium of rat. **J. Periodontol.**, Chicago, v. 59, n. 12, p. 823-829, Dec. 1988.

TAYLOR, A.; NALLY, J.; AURELL, M. Consensus report on ACE inhibitor renography for detecting renovascular hypertension. **J. Nucl. Med.**, New York, v. 37, p. 1876-1872, 1996

TAYLOR, G. N. Bidirectional interrelationships between diabetes and periodontal diseases: An epidemiological perspective. **Ann. Periodontol.**, Chicago, v. 6, n. 1, p. 99-112, 2001.

TONETTI, M. S. Cigarette smoking and periodontal diseases: etiology and management of disease. **Ann. Periodontol.**, Chicago, v. 3, n. 1, p. 88-101, 1998.

TROMBELLI, L.; TATAKIS, D. N. Periodontal diseases: current and future indications for antimicrobial therapy. **Oral Dis.**, Copenhagen, v. 9, p. 11-15, 2003.

UNGER, T. et al. Tissue reninangiotensin systems: fact or fiction?. **J. Cardiovasc. Pharmacol.**, Hagerstown, v. 18, Suppl. 2, p. S20-25, 1991.

VOLVEK, H. et al. Gender differences in the relation between number of teeth and systolic blood pressure. **J. Hypert.**, London, v. 24, n. 7, p. 1257-1263, 2006.

WEINBERG, M. A.; BRAL, M. Laboratory animal models in periodontology. **J.Clin. Periodontol.**, Copenhagen, v. 26, p. 335-340, 1999.

WOLF, G.; BUTZMANN, U.; WENZEL, U. O. The reninangiotensin system and progression of renal disease: from hemodynamics to cell biology. **Nephron Physiology**, Basel, v. 93, p. 3-13, 2003.

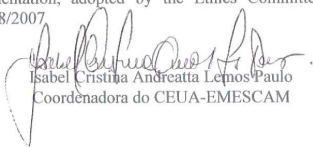
ZOELLNER, H. et al. Microvasculature in gingivitis and chronic periodontitis: Disruption of vascular networks with protracted inflammation. **Microscopy research and technique.**, New York, v. 56, p. 15-31, 2002.

**ANEXO A - APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA)
DA ESCOLA SUPERIOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE DA SANTA CASA DE
MISERICÓRDIA DE VITÓRIA (EMESCAM)**

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº 014/2007, relativo ao projeto intitulado "**Efeitos da Hipertensão Arterial na Periodontite Experimental em Ratos**", que tem responsável **Silvana dos Santos Meyrelles**, está de acordo com os princípios Éticos da Experimentação Animal, Adotados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA-EMESCAM), tendo sido aprovado na reunião ordinária de 13/08/2007. Este certificado expira-se em 13/08/2011.

We hereby certify that the Protocol nº 014/2007, related to the project entitled "**Effects of Arterial Hypertension on Experimental Periodontitis in Rats**", under the supervision of **Silvana dos Santos Meyrelles**, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Experimentation, adopted by the Ethics Committee in Animal Experimentation (CEUA-EMESCAM), and was approved in 13/08/2007.


Isabel Cristina Andreatta Lemos Paulo
Coordenadora do CEUA-EMESCAM



ANEXO B – CONTAGEM DE NEUTRÓFILOS

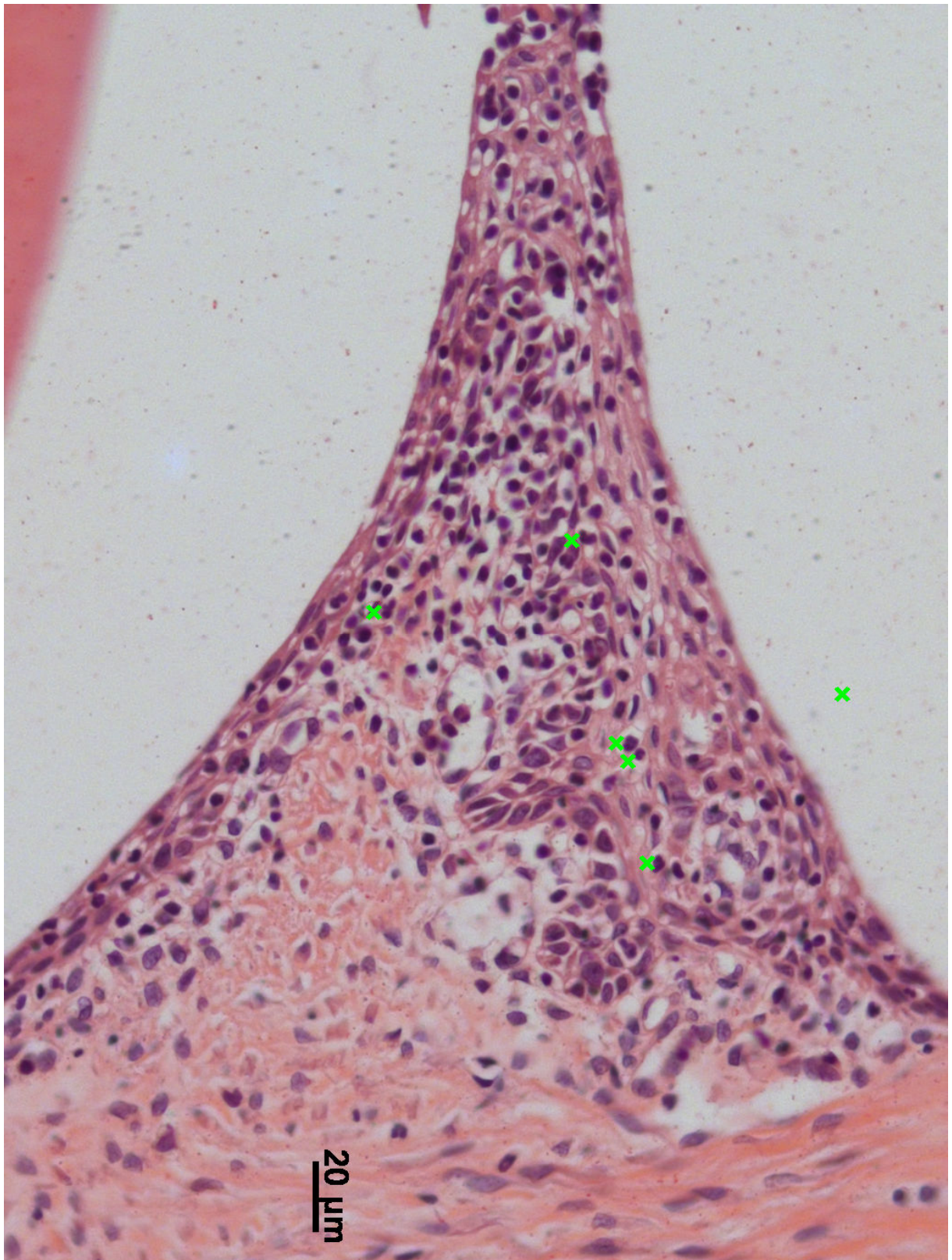


Figura 1. Região interproximal distal do primeiro molar inferior sem ligadura

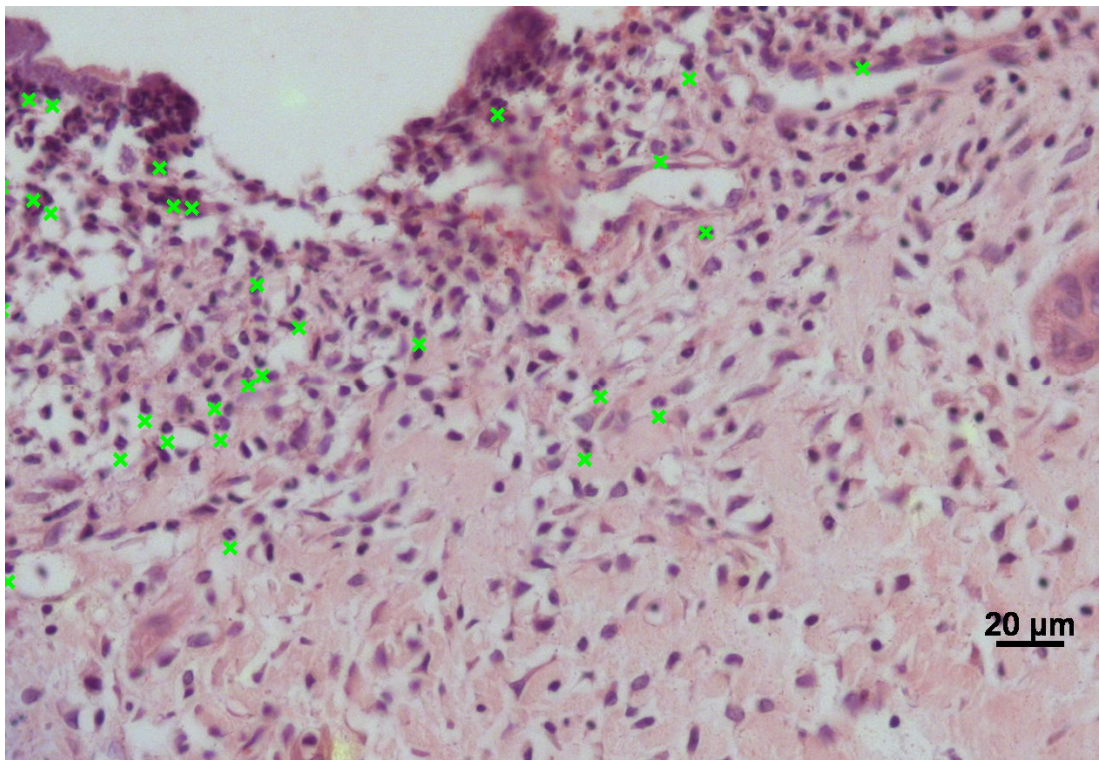


Figura 2. Região interproximal distal do primeiro molar inferior com ligadura